

Leonardo Berlim Schneider

**FLUORÓFOROS SINTÉTICOS E NATURAIS PARA  
APLICAÇÕES EM DIAGNÓSTICOS**

**Curitiba**

2014

Leonardo Berlim Schneider

**FLUORÓFOROS SINTÉTICOS E NATURAIS PARA  
APLICAÇÕES EM DIAGNÓSTICOS**

Tese de Doutorado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Física do Setor de Ciências Exatas da Universidade Federal do Paraná, como requisito parcial para a obtenção do grau de Doutor em Ciências.

Orientador: Prof. Dr. Wido Herwig Schreiner

**Curitiba**

2014

---

S358f

Schneider, Leonardo Berlim

Fluoróforos sintéticos e naturais para aplicações em diagnósticos /  
Leonardo Berlim Schneider. – Curitiba, 2014.  
140f. : il. color. ; 30 cm.

Tese - Universidade Federal do Paraná, Setor de Ciências Exatas,  
Programa de Pós-graduação em Física, 2014.

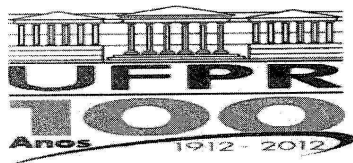
Orientador: Wido Herwig Schreiner .

Bibliografia: p. 100-108.

1. Fluorescência - Uso em diagnóstico. 2. Espectroscopia de  
fluorescência. 3. Eletroluminescência.. I. Universidade Federal do Paraná. II.  
Schreiner, Wido Herwig. III. Título.

CDD: 543.56

---



MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO  
UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ  
SETOR DE CIÊNCIAS EXATAS  
CURSO DE PÓS-GRADUAÇÃO EM FÍSICA  
Fone: (41) 3361-3096 Fax: (41) 3361-3418  
E-mail: [posgrad@fisica.ufpr.br](mailto:posgrad@fisica.ufpr.br)

## DEFESA DE TESE DE DOUTORADO

**Fluoróforos Sintéticos e Naturais para Aplicações em Diagnósticos.**

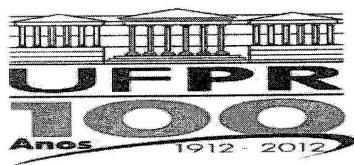
**ALUNO**

**LEONARDO BERLIM SCHNEIDER**

Em sessão pública iniciada às nove horas do dia 31 de julho de 2014, após um seminário sob o título acima e posterior arguição, esta banca examinadora decidiu aprovar o candidato com o conceito global A.

| Banca Examinadora   | Assinatura | Conceito |
|---|------------|----------|
| Prof. Dr. Wido Herwig Schreiner<br>(UFPR)                 |            | <u>A</u> |
| Prof. Dr. Guinther Kellermann<br>(UFPR)                   |            | <u>A</u> |
| Prof. Dr. Sergio d'Almeida Sanchez<br>(UFPR)              |            | <u>A</u> |
| Prof. Dr. Amando Siuiti Ito<br>(USP-Ribeirão Preto)       |            | <u>A</u> |
| Profa. Dra. Paula Cristina Rodrigues<br>(UTFPR - Química) |            | <u>A</u> |





MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO  
UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ  
SETOR DE CIÊNCIAS EXATAS  
CURSO DE PÓS-GRADUAÇÃO EM FÍSICA  
Fone: (41) 3361-3096 Fax: (41) 3361-3418  
E-mail: [posgrad@fisica.ufpr.br](mailto:posgrad@fisica.ufpr.br)

## PARECER

Os abaixo-assinados membros da banca examinadora de Defesa de Tese de Doutorado do aluno LEONARDO BERLIM SCHNEIDER, consideram aprovada a redação final da tese, cujo título é: *"Fluoróforos Sintéticos e Naturais para Aplicações em Diagnósticos"*.

Curitiba, 31 de julho de 2014.

### Banca Examinadora

Prof. Dr. Wido Herwig Schreiner  
(UFPR)

Prof. Dr. Guinther Kellermann  
(UFPR)

Prof. Dr. Sergio d'Almeida Sanchez  
(UFPR)

Prof. Dr. Amando Siuiti Ito  
(USP-Ribeirão Preto)

Profa. Dra. Paula Cristina Rodrigues  
(UFPR - Química)

Assinatura

# RESUMO

Fluoróforos vêm sendo utilizados extensivamente em diversas áreas do conhecimento, como em biotecnologia, ciência forense, análise genética, diagnósticos médicos e ciências de base. A fluorescência ocorre tipicamente a partir de moléculas aromáticas, as quais podem ser excitadas de diversas maneiras. Um processo importante no estudo da fluorescência é a Transferência de Energia por Ressonância Förster (FRET), que ocorre no estado excitado quando o espectro de emissão de um fluoróforo sobrepõe-se com o espectro de absorção de outra molécula fluorófora. Esta fluorescência nem sempre é desejada, pois em diagnósticos há a necessidade de observar ou não a luminescência de acordo com os resultados do imunoensaio. Esta fluorescência pode ser suprimida e reinstituída de acordo com o ensaio a ser realizado. Geralmente os fluoróforos comerciais são caros e possuem propriedades muito específicas, tornando o uso em diagnósticos demasiadamente restritos. O estudo dessas moléculas torna-se mais sólido quando há um embasamento teórico que corrobora com a experimentação, abrindo portas para as aplicações tecnológicas. Neste contexto, os flavonóides naturais estudados no presente trabalho podem ser assimilados pelos Imunoensaios por Fluxo Lateral (*lateral flow*), reduzindo custos, aumentando a rapidez, eficiência e acurácia dos resultados. No presente trabalho foram estudadas várias espécies de fluoróforos, sintéticos e naturais. Foram comprovados os princípios físicos responsáveis pelo aspecto metálico da haste seca de *S. nitens*, o qual forneceu os flavonóides naturais apresentados nesta tese. Também foram comprovados os mecanismos de fluorescência das moléculas em questão, as quais foram utilizadas satisfatoriamente na implementação do teste diagnóstico em voga.

# ABSTRACT

Fluorophores have been extensively used in many areas of knowledge, such as biotechnology, forensics, genetic analysis, medical diagnostics and basic sciences. Fluorescence typically occurs in aromatic molecules, which can be excited in several ways. An important process in the fluorescence study is Förster Resonance Energy Transfer (FRET), which occurs when the excited state emission spectrum of a fluorophore overlaps with the absorption spectrum of another fluorophore molecule. This fluorescence is not always desired, because in diagnostics there is a necessity to observe or not the luminescence, according to the immunoassay results. This fluorescence can be quenched and restored according the performed immunoassay. Generally, commercial fluorophores are expensive and have many specific properties, making the application too restricted for diagnostics. The study of these molecules is strengthened when the theoretical calculation supports experimentation, leading to technological applications. Within the study of natural flavonoids, their application can be assimilated by Lateral Flow Immunochromatographic Assays, reducing costs, increasing speed, efficiency and accuracy results. In this work, several species of fluorophores, synthetic and natural, were studied. The physical principles responsible for the metallic aspect of the dry stem of *S. nitens*, which provided natural flavonoids presented in this thesis, were proven. The molecule fluorescence mechanisms studied have been successfully implemented in the diagnostic test and were also demonstrated.

# Agradecimentos

Agradeço, primeiramente, ao Prof. Dr. Wido Herwig Schreiner. Desde minha primeira aula em sua turma de Física Moderna até os dias atuais, seu conhecimento e sabedoria sempre me motivaram a ir além daquilo que aprendemos. Agradeço pela grande paciência, dedicação, orientação e amizade durante estes anos todos.

Devo minha vida aos meus pais, Ivo e Franci. Agradeço por me darem educação, apoio, amor e carinho. Sou eternamente grato a eles.

Sou muitíssimo grato ao Zé Danilo e Camila, que sempre deram apoio, ajuda e contribuíram com minha formação. Vocês são irmãos muito queridos, jamais esquecerei!

Também agradeço ao Prof. Dr. Arandi Ginane Bezerra Junior, sua dedicação, paciência, motivação e amizade colaboraram muito para a realização deste trabalho e ajudaram em momentos difíceis durante estes anos. Não só contribuiu para a formação de um doutor, como ajudou na formação como pessoa.

Meus agradecimentos também ao Prof. Cyro Ketzer Saul, que sempre ajudou, dando dicas, sugestões e incentivos não só para o trabalho, mas para a vida.

Agradeço à Prof.<sup>a</sup> Dr.<sup>a</sup> Kaline Coutinho, que me recebeu de braços abertos em São Paulo e me ajudou com alguns problemas teóricos, dando dicas e pistas de onde e como proceder naquelas situações.

Agradecimentos também aos amigos e colegas, da Física e fora dela. Agradeço ao laboratório LaPPS, especialmente à Prof.<sup>a</sup> Dr.<sup>a</sup> Leni Akcelrud, ao pessoal da química pela paciência e ajuda, o Bruno Nowacki, Claudião Ciulik, Cristiano Zanlorenzi e Denis Turchetti. Também agradeço minha amiga e causídica Fabi Pimentel, nossas conversas e discussões sobre todas as coisas sempre ajudaram a ampliar meu conhecimento sobre diferentes áreas e minha criatividade pessoal e laboral.

Não posso deixar de agradecer aos meus amigos Flubber “Rudolf”, Baboo “Luis” Nishino e David Kretschek. Sempre estiveram presentes, instigaram e ajudaram neste trabalho e em outros projetos. Também agradeço à Mad Bunch, que teve muita paciência e proporcionou uma certa fuga dos momentos de marasmo do cotidiano.

Como todos aqueles que passam pelo curso de Física da UFPR, não posso deixar de agradecer o grande salvador de todos os tempos, Marcão da Coordenação. Sem ele, com certeza, seria quase impossível atender às burocracias infinitas do departamento.

Agradeço ao meu grande amigo Ezequielson, filho de Ezequiel, vulgo Ezequíaz Malaquíaz, também conhecido como Zeqbur, o Sultão de Mandirituba. Ele começou como irmão mais velho de laboratório e acabou entrando para a família definitivamente. Esteve pouco presente durante estes 4 anos de doutoramento, mas, das vezes que esteve, suas palavras e amizade foram fundamentalmente essenciais.

Por fim, agradeço especialmente à Polyana Pilatti Aguida. Ela transformou minha vida e deu mais brilho. Pensei que jamais encontraria alguém como ela, atenciosa, companheira, querida e sábia. Sua ajuda desde o momento em que a conheci colaborou muito com meu modo de ver os problemas e o mundo. Tenha certeza que você fez muita diferença em minha vida e continuará fazendo!

Leonardo Berlim Schneider  
SETEMBRO, 2014

*“I have spent my whole life trying to figure out crazy ways of doing things.”*

Montgomery Scott

*“Invention is the most important product of man's creative brain. The ultimate purpose is the complete mastery of mind over the material world, the harnessing of human nature to human needs.”*

Nikola Tesla

# Conteúdo

|          |  |           |
|----------|--|-----------|
| <b>1</b> | <b>Introdução</b>  | <b>1</b>  |
| <b>2</b> | <b>Fundamentação</b>   | <b>7</b>  |
| 2.1      | Fotoluminescência .....  | 7         |
| 2.2      | Transferência de Energia por Ressonância Förster (FRET) .....  | 10        |
| 2.3      | Supressão de fluorescência ( <i>Quenching</i> ) .....  | 16        |
| 2.3.1    | Supressão da fluorescência de colisão .....  | 17        |
| 2.4      | Método Computacional .....   | 20        |
| 2.4.1    | Cálculos <i>ab initio</i> e semiempírico .....   | 20        |
| 2.4.2    | A Aproximação de Born-Oppenheimer .....  | 22        |
| 2.4.3    | Método de Hartree-Fock .....   | 24        |
| 2.4.4    | Teoria do Funcional de Densidade (DFT) .....   | 26        |
| 2.4.4.1  | Funcional Híbrido B3LYP .....  | 28        |
| <b>3</b> | <b>Materiais e métodos</b>   | <b>29</b> |
| 3.1      | Experimental .....   | 29        |
| 3.2      | Teórico .....  | 31        |
| 3.2.1    | Exemplo de arquivo de entrada .....  | 32        |
| <b>4</b> | <b>Resultados e Discussão</b>  | <b>35</b> |
| 4.1      | LaPPS40 .....  | 35        |
| 4.1.1    | Caracterização do Polímero .....   | 36        |
| 4.1.2    | Fluorescência do LaPPS40 com adição de nano-partículas de ouro .....                                 | 47        |
| 4.2      | <i>Syngonanthus nitens</i> (Bong.) Ruhland .....   | 53        |
| 4.2.1    | Introdução .....   | 53        |
| 4.2.2    | Caracterização .....   | 54        |
| 4.2.3    | Simulação das propriedades fotofísicas dos flavonóides do extrato da haste de <i>S. nitens</i> ..... | 65        |
| 4.2.4    | Interpretação da cor dourada do <i>S. nitens</i> .....   | 71        |
| 4.2.5    | Fotodegradação e transferência de energia entre flavonóides no extrato de <i>S. nitens</i> .....     | 72        |
| 4.2.6    | Fluorescência do extrato de <i>S. nitens</i> com adição de nano-partículas de ouro .....             | 76        |
| 4.3      | Quercetina e Sakuranetina .....  | 78        |
| 4.3.1    | Absorção e Fluorescência: Experimental .....   | 80        |
| 4.3.2    | Simulação e otimização teórica .....   | 84        |

|          |   |            |
|----------|---|------------|
| 4.4      | Prova de conceito do emprego dos flavonóides fluorescentes em diagnóstico por Fluxo Lateral ( <i>Lateral Flow</i> ) ..... | 87         |
| 4.4.1    | Introdução .....  | 87         |
| 4.4.2    | Testes com fluoróforos naturais no <i>lateral flow</i> .....  | 91         |
| <b>5</b> | <b>Considerações Finais</b>   | <b>94</b>  |
| <b>6</b> | <b>Conclusões</b>   | <b>95</b>  |
| <b>7</b> | <b>Apêndice</b>   | <b>97</b>  |
| 7.1      | Teoremas de Hohenberg e Kohn .....  | 97         |
| 7.1.1    | Primeiro teorema .....  | 98         |
| 7.1.2    | Segundo teorema .....   | 99         |
| <b>8</b> | <b>Referências Bibliográficas e Patentes</b>  | <b>100</b> |
| <b>9</b> | <b>Anexos</b>   | <b>109</b> |



# 1 Introdução

Durante os últimos 30 anos houve um notável crescimento do uso da fluorescência em ciências biológicas [1]. Apenas alguns anos atrás, a espectroscopia de fluorescência e fluorescência resolvida no tempo eram as principais ferramentas de investigação em bioquímica e biofísica. Esta situação mudou de modo que a fluorescência é agora utilizada em diferentes áreas, como em monitoramento ambiental [2], seqüenciamento de DNA [3][4] e análise genética por hibridização fluorescente *in situ* (FISH) [5]. Devido à sensibilidade e facilidade de detecção da fluorescência há um contínuo desenvolvimento de exames médicos com base no fenômeno da fluorescência. Estes testes incluem o imunoensaio de enzima (ELISA) [6] e imunoenaios de fluorescência polarizada [7].

O desenvolvimento de marcadores para imunoenaios avança lado a lado com os avanços na metodologia de detecção e instrumentação, pois os diagnósticos desempenham vários papéis críticos na área da saúde, como a prestação de atendimento adequado e eficiente aos pacientes [8]. Nesta área há muitas técnicas consagradas e diversas tecnologias sendo desenvolvidas e implementadas. Um recurso amplamente utilizado é o imageamento e análise de imagens, onde a microscopia continua sendo uma das tecnologias mais importantes para uma ampla gama de doenças. Porém, apesar de ser a técnica mais confiável, a preparação das amostras continua sendo um obstáculo, pois requer pessoal treinado e grande número de amostras. Outra técnica muito utilizada é a Citometria de Fluxo, na qual conta-se rapidamente e classificam as células de acordo com sua morfologia ou na presença de antígenos de superfície específicos [9]. Estas células ficam suspensas em um líquido que flui por canais, as quais são detectadas com auxílio de aparelhos optoeletrônicos [10]. Estas técnicas classicamente requerem o uso de grande número de equipamentos, pois são realizados em diversas etapas, muitas vezes com diversos métodos. Neste sentido, os dispositivos microfluídicos podem facilitar este aspecto do imageamento e citometria, pois possuem baixos custos e não requerem treinamento de alto nível. Uma das características mais interessantes da microfluídica é na automação de preparo de amostras em pequenos laboratórios chamados *lab-on-a-chip*, os quais oferecem capacidades de diagnósticos em testes rápidos que podem revolucionar a medicina [11]. Os dispositivos microfluídicos foram concebidos para os bioensaios laboratoriais mais comuns, incluindo Reação em Cadeia da Polimerase (PCR) e imunoenaios [10]. A PCR é uma tecnologia bioquímica em biologia

molecular utilizada para amplificar uma sequência de DNA específica em várias ordens de grandeza, gerando milhares de cópias desta mesma sequência de DNA. Este fator pode chegar a  $10^6$ , facilitando uma variedade de manipulações analíticas subseqüentes [12]. Uma técnica que é amplamente utilizada em diagnósticos é o Teste ou Imunoensaio por Fluxo Lateral (*lateral flow*). Os testes *lateral flow* são dispositivos simples, destinados a detectar a presença ou ausência de um analito alvo na amostra, sem a necessidade de equipamento especializado e dispendioso. Normalmente, esses testes são utilizados para o diagnóstico médico ou em testes caseiros, assim como os testes rápidos (*point-of-care*) [13], que são realizados no local de atendimento ao paciente, ou o uso em laboratório e exames médicos. Um exemplo muito comum destes testes é o teste de gravidez [10]. Alguns exemplos de testes *lateral flow* comerciais podem ser vistos na Figura 1.

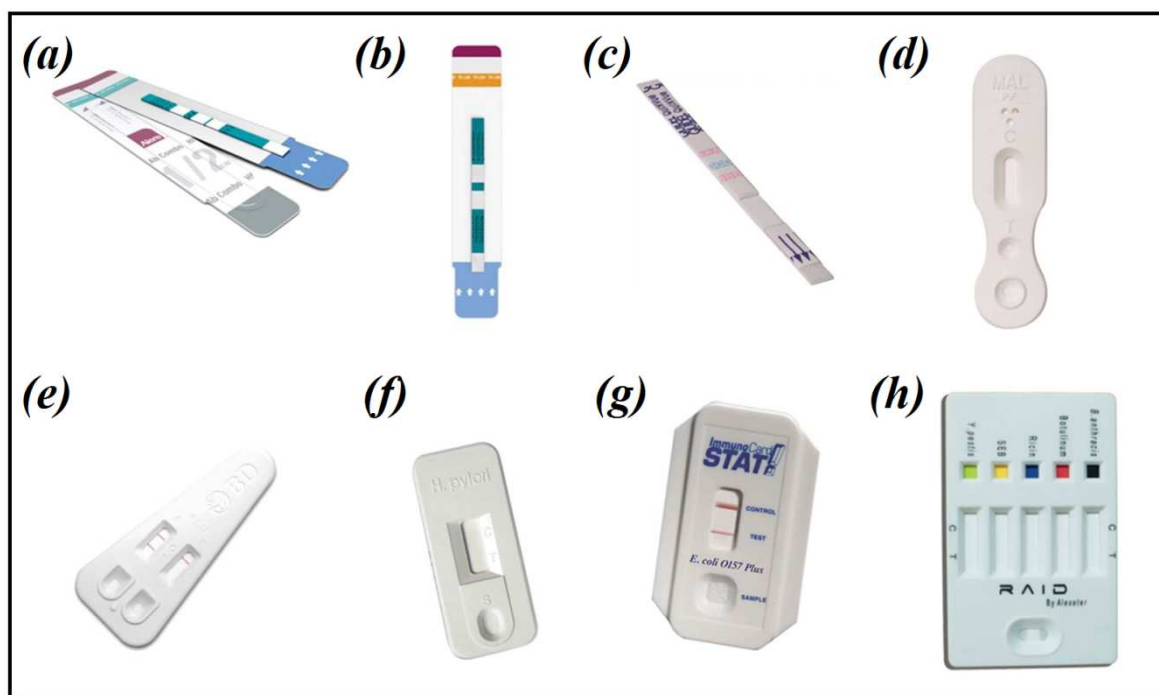


Figura 1: Testes rápidos comerciais (*lateral flow*). (a) Determine<sup>TM</sup> HIV 1/2 Ag/Ab Combo. © 2013 Alere. (b) Determine<sup>TM</sup> TB LAM Ag test. © 2013 Alere. (c) QuickVue Influenza A + B test. Quidel Corporation. (d) Clearview<sup>®</sup> Malaria P.f. Test. © 2013 Alere. (e) Directigen<sup>TM</sup> EZ Flu A + B. Beckton Dickinson. (f) ICON HP. Beckman Coulter. (g) ImmunoCard STAT!<sup>®</sup> E. coli O157 Plus. Meridian Bioscience. (h) Ensaio multiplexado lateral flow. RAID<sup>TM</sup> 5 para a detecção de agentes de ameaça biológica. Alexeter Technologies. (Adaptada de [14]).

A tecnologia baseia-se numa série de leitos capilares, tais como pedaços de papel poroso, nitrocelulose ou materiais poliméricos. Alguns elementos são os responsáveis pelo transporte fluídico no interior do dispositivo e outros como marcadores biológicos, os quais comumente são nano-partículas bio-ativas otimizadas para que haja a reação química entre a molécula alvo (por exemplo, um antígeno) e a sua parceira química (por exemplo, anticorpo) que foi imobilizada na superfície da nano-partícula. Estas nano-partículas, quando imobilizadas bioquimicamente, são chamadas de conjugados [15].

Além das nano-partículas outros materiais são utilizados como marcadores. As lisossomas são visículas formadas por duas camadas lipídicas, capazes de encapsular grandes concentrações de tintas visíveis ou fluorescentes, enzimas e componentes eletroativos [9]. Porém, sua relativa instabilidade e susceptibilidade à lise celular pelos surfactantes a torna substituível facilmente no mercado de diagnósticos rápidos. Isto dá lugar aos produtos coloidais, os quais são a base para a maioria dos testes *lateral flow* conhecidos. Reportado nos anos 70, o carbono coloidal teve um revés em sua tentativa de utilização em imunoensaios, mas apenas em 1993 discutiu-se a idéia de ser reintroduzido neste contexto [9]. Desta forma, abriu-se portas aos metais coloidais. Nano-partículas de ouro [16] e prata [17] são os materiais mais utilizados em testes *lateral flow* por diversos motivos, a facilidade de serem sintetizados, o baixo custo relativo, as cores intensas e sua estabilidade em líquidos contribuem para a implementação destes nos imunoensaios [9]. Os métodos de diagnósticos por fluorescência já são utilizados em diversos países [18]. As moléculas fluorescentes, chamadas de fluoróforos, podem ser de diversos tipos, lantanídeos complexos [19], moléculas orgânicas naturais [20], pontos quânticos [21] e proteínas ativadas [22]. Mas os imunoensaios não se utilizam apenas de fluoróforos como marcadores, diversos estudos abrem caminho para os marcadores enzimáticos [23][24], partículas paramagnéticas [25] e partículas de látex [26].

Um exemplo clássico de detecção é apresentado na Figura 2, em que é utilizado um método com microesferas (*beads*) que detectam doenças. Estas microesferas possuem um mecanismo de captura de analitos (moléculas alvo de uma análise química), que por sua vez ligam-se a partículas codificadas com fluoróforos. Quando o teste é executado, um determinado tipo de analito adere à microesfera de captura. Em seguida, moléculas repórter rotuladas com fluoróforo específico são anexadas ao analito e expostas a um *laser* ou *led* que excitarão o fluoróforo. Caso o analito não esteja presente, não haverá conexão entre a molécula de captura e a molécula repórter e o resultado será negativo para aquele tipo de analito.

### Microesfera

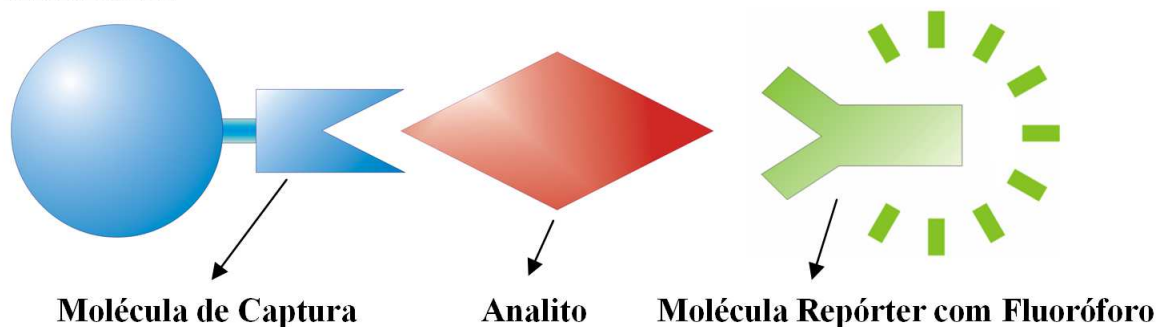


Figura 2: Esquema de detecção de um analito por uma esfera ativada por uma molécula ligante de captura e microesfera rotulada com fluoróforo ativada por molécula ligante repórter. Figura extraída de [27].

Em parceria com o IBMP/FIOCRUZ, há a necessidade de desenvolver completamente um dispositivo de diagnóstico simples e que utilize a fluorescência para os imunoenaios.

No mercado, estes testes chegam a custar de U\$25 até U\$400 por *kit*, e seus analisadores vão de U\$3000 a U\$100000. Nos testes do tipo *lateral flow* estes valores são reduzidos, onde cada imunoenasão pode custar até U\$10, podendo haver a utilização ou não de instrumentos de análise, que dependerá apenas da opção do usuário. De acordo com *Bangs Laboratories Inc.*<sup>TM</sup>, a previsão de gastos na confecção de cada teste *lateral flow* é em torno de U\$0,38, o que não inclui outros custos, como importação, controle de qualidade, logística e SAC. Os detalhes sobre este orçamento podem ser vistos na seção Anexos.

O interesse do presente trabalho é o estudo dos fluoróforos e sua aplicação direta nestes testes diagnósticos.

Em uma primeira parte foi feita a caracterização completa de um copolímero fluoróforo inédito. Foi realizada uma comparação entre propriedades medidas experimentalmente e propriedades obtidas através de métodos teóricos *ab initio* de um copolímero fluoreno-benzotiadiazol. O poli[9, 9-bis(3'-(t-butil propanoato))fluoreno-co-4,7-(2,1,3-benzotiadiazol)], doravante chamado LaPPS40, foi obtido através da rota Suzuki [28] em parceria com o Laboratório de Polímeros Paulo Scarpa (LaPPS) da UFPR. O polímero foi caracterizado utilizando um microscópio eletrônico de varredura, cromatografia por permeação em gel, Ressonância Magnética Nuclear (RMN), análise térmica, voltametria

cíclica, espectroscopia de fotoelétrons excitados por raios-x, difração de raios-x, espectroscopia UV-Vis e experimentos fotofísicos. Além disso, a estrutura molecular polimérica foi otimizada teoricamente utilizando o método da Teoria do Funcional da Densidade (DFT - *Density Functional Theory*) e calculadas as energias de HOMO/LUMO (energias do último orbital ocupado e do primeiro orbital desocupado, respectivamente), assim como obtidos os espectros de infravermelho e UV-Vis. A otimização de geometria é um procedimento teórico que consiste em calcular os mínimos de energia para que tenhamos a disposição dos átomos de uma molécula cuja forma espacial não é anteriormente conhecida. Este copolímero, devido ao seu brilho e longo deslocamento de Stokes (que será explicado em seção posterior), poderia servir de marcador biológico nos testes diagnósticos. A detecção seria feita através da supressão ou aparecimento da sua fluorescência. Quando nanopartículas de ouro estão próximas das moléculas, fluorescentes, de LaPPS40, há uma supressão de sua fluorescência. Previamente, estas nano-partículas seriam ligadas a um anticorpo (ou antígeno), o qual pode ser ligado ao analito, referente a uma determinada doença [15]. O LaPPS40 é ligado a uma molécula biológica específica, a qual capturaria o analito. Caso não haja presença do analito, o LaPPS40 não capturaria as nano-partículas de ouro, mantendo sua fluorescência.

A segunda etapa deste trabalho foi investigar sobre as propriedades ópticas de uma planta conhecida como capim dourado (*Syngonanthus nitens*), pois nunca antes estas propriedades foram estudadas. A haste seca do *S. nitens* possui uma cor e brilho dourados, característicos dos metais. O estudo destas características conduziu, mais tarde, ao estudo dos flavonóides contidos nesta planta, verificando-se a existência de fluorescência nestas moléculas.

Foram realizados procedimentos experimentais e cálculos teóricos para determinar algumas propriedades ópticas dos flavonóides, as quais poderiam contribuir com o aspecto dourado da haste do *S. nitens*. Desta maneira foi feita a caracterização dos 8 tipos de flavonóides encontrados na haste [29]. Verificou-se que estes flavonóides ainda não haviam sido estudados utilizando métodos *ab initio* e semi-empírico; com base nisso, foram realizados cálculos, os quais foram comparados posteriormente com os resultados experimentais. As medidas de fluorescência do extrato da haste do capim dourado também são inéditas.

O estudo de sua fluorescência mostrou compatibilidade com os resultados teóricos, os quais foram comparados com os resultados de dois flavonóides comerciais, a quercetina e a sakuranetina, pois possuem estruturas moleculares químicas muito semelhantes às estruturas

moleculares dos flavonóides da haste do capim dourado. Verificou-se que ambas apresentam emissão em uma região próxima ao do comprimento de onda de emissão dos flavonóides naturais.

Após esta etapa de estudos surgiu a idéia de que poderíamos utilizar estes flavonóides na implementação de um destes multi-testes comerciais consagrados, o *lateral flow*, o qual necessita de menos tecnologia de produção, é mais simples e mais barato [9]. Por serem fluoróforos naturais abundantemente encontrados e facilmente extraídos de plantas comuns, estes custos seriam reduzidos ainda mais. Esta aplicação dos flavonóides do capim dourado em imonuais é completamente original, alavancando o estudo da supressão de fluorescência com a presença de nano-partículas. Este estudo é de extrema importância para a realização de testes diagnósticos.

Desta forma, conseguiu-se implementar tanto os flavonóides comerciais estudados no presente trabalho, quanto os flavonóides do capim dourado, em um teste diagnóstico que atende aos propósitos do projeto Rede Cegonha do Governo Federal, financiado pela FINEP e liderado pela FIOCRUZ Paraná.

No Capítulo 2 fundamenta-se os métodos computacionais utilizados, com ênfase no método *ab initio*, e a teoria de fluorescência, passando pela transferência de energia por ressonância e pela supressão de fluorescência. Este capítulo procura apontar os conceitos básicos e as equações regentes que descrevem os mecanismos de fluorescência das moléculas estudadas.

No Capítulo 3 discute-se os materiais e métodos experimental e teórico utilizados no presente trabalho.

No Capítulo 4 é reportado todo processo experimental e teórico e os resultados, passando por otimizações de geometria, cálculos de energias e absorções ópticas, até as comparações com a experimentação e, finalmente, a aplicação em dispositivo de diagnóstico.

No Capítulo 5 e 6 são apresentadas as considerações finais e as conclusões do trabalho, envolvendo as moléculas estudadas e a implementação destas nos testes diagnósticos.

Na seção de Anexos constam três artigos publicados referentes ao presente trabalho, dois sobre copolímeros distintos e um sobre o *S. nitens*, e o prospecto da *Bangs Laboratories Inc.*<sup>TM</sup> com a previsão de gastos na confecção do nosso teste *lateral flow*.

## 2 Fundamentação

### 2.1 Fotoluminescência

A luminescência é um processo no qual um átomo ou molécula absorve radiação eletromagnética e, em seguida, re-irradia fótons. A mecânica quântica descreve este mecanismo como sendo uma excitação para um estado de maior energia e, em seguida, um retorno a um estado de energia mais baixo acompanhada pela emissão de um fóton [30][31]. O conceito de luminescência (emissão de luz) é muito abrangente, mas, comumente, este processo distingue-se da fotoexcitação, onde há apenas excitação por fótons [32]. Para o caso da fluorescência, o período entre a absorção e emissão é geralmente muito curto (estado singlete), na ordem de 10 nanossegundos [32]. Em circunstâncias especiais, contudo, este intervalo de tempo pode ser estendido em minutos ou horas, o que é chamado na química de fosforescência, ou decaimento de estado tripleto [32].

Esses estados de energia disponíveis e transições permitidas entre estados (e, portanto, comprimentos de onda da luz absorvida e emitida preferencialmente) são determinados pelas regras da mecânica quântica (processo de relaxação vibracional e acoplamento *spin*-órbita). Uma compreensão básica dos princípios envolvidos pode ser obtida pelo estudo das configurações de elétrons e orbitais moleculares de átomos e moléculas simples. Moléculas mais complicadas são tratadas na área de físico-química ou química computacional.

Existem diversas formas de se obter a fotoluminescência. Dentre processos mais simples de fotoluminescência estão as radiações de ressonância, em que um fóton de um determinado comprimento de onda é absorvido e um fóton equivalente é emitido imediatamente. Este processo não envolve transições significativas de energia interna do substrato luminescente entre absorção e emissão [32].

Na fluorescência, parte da energia inicial é dissipada, fazendo com que os fótons de luz emitidos sejam de baixa energia quando comparada com a energia de absorção. O fóton gerado neste caso é dito “deslocado para o vermelho”, referindo-se à perda de energia. Este deslocamento é conhecido como deslocamento de Stokes (*Stokes shift*), sendo comumente definido como a diferença, em unidades de comprimento de onda ou de frequência, entre as

posições no espectro dos pontos máximos das bandas de absorção e emissão de fluorescência para a mesma transição eletrônica [32].

Fotoluminescência é uma técnica importante para medir a pureza e a qualidade cristalina de semicondutores, tais como o GaAs e InP. Existem diversos tipos de fotoluminescência, inclusive de fotoluminescência de excitação (PLE) [33].

A fotoluminescência resolvida no tempo (*time-resolved photoluminescence* - TRPL) é um método onde a amostra é excitada com um pulso de luz e depois é feita a medida de fotoluminescência em função o tempo durante a desexcitação. Esta técnica é útil para medir o tempo de vida de portadores minoritários de semicondutores III-V como o GaAs [34].

Outra forma comum de fotoluminescência é fosforescência, em que a energia absorvida de fótons sofre cruzamento entre estados de multiplicidade de *spin* diferentes. A relaxação vibracional e o acoplamento spin-órbita podem fazer com que curvas de potencial se cruzem, gerando o cruzamento intersistemas. Quando a energia é referente ao estado tripleto, a transição de volta para os estados de menor energia (singleto) é proibida pela probabilidade de transição com o inverso do *spin* [32]. Desta forma a transição ocorre muito mais lentamente do que outras transições, como visto no diagrama de Perrin-Jablonski na Figura 3.

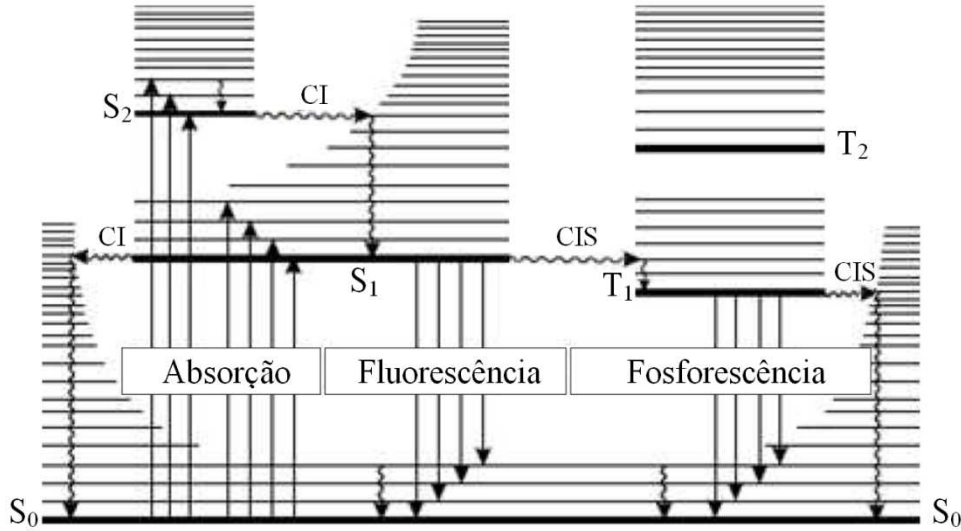
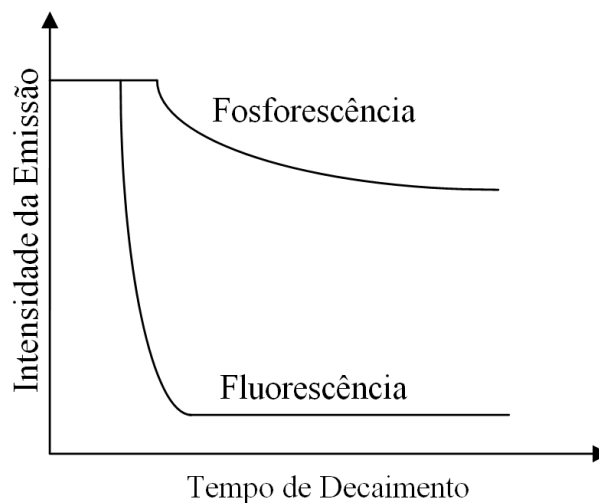


Figura 3: Diagrama de Perrin-Jablonski, mostrando as possíveis transições energéticas durante a absorção e emissão de luz em moléculas orgânicas. CI: conversão interna; CIS: cruzamento intersistema; S<sub>n</sub>: Singleto e T<sub>n</sub>: Tripleto. Figura adaptada de [33].



O resultado é um processo lento de transição radiativa para o estado singlete, às vezes durando minutos ou horas [35]. Há diversas aplicações para este processo físico, como na área de sensoriamento e como marcadores biológicos.

A luminescência é dividida em duas categorias, fluorescência e fosforescência, e depende da natureza de seu estado excitado. Na fluorescência, a radiação espontaneamente emitida é interrompida logo que a radiação excitadora desaparece. Na fosforescência, a emissão espontânea persiste durante intervalos de tempos longos (até horas, mas segundos ou frações de segundos nos casos mais característicos) depois da excitação [36]. A diferença sugere que a fluorescência é uma conversão da radiação absorvida que é reemitida e que a fosforescência envolve o armazenamento da energia num “reservatório” de onde lentamente se esvai [32], ilustrado na Figura 4.



*Figura 4: Diferença empírica observada entre fluorescência e fosforescência. Figura adaptada de [34].*

Há duas maneiras distintas de se observar a fluorescência e a fosforescência: fotoluminescência, em que a excitação ocorre por absorção de luz (ultravioleta, visível ou infravermelha) por uma molécula, e eletroluminescência, onde a emissão de luz se dá a partir da aplicação de uma diferença de potencial (ddp) diretamente no material. Nem todo

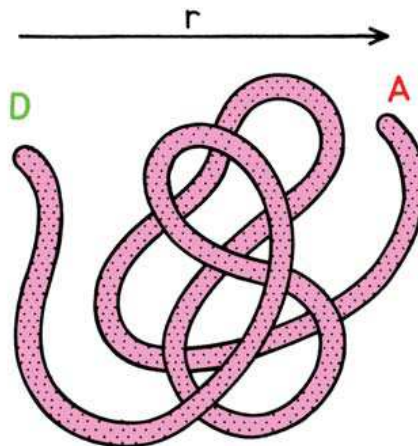
polímero fotoluminescente é eletroluminescente, mas a fotoluminescência é condição necessária para a eletroluminescência [37].

## **2.2 Transferência de Energia por Ressonância Förster (FRET)**

A Transferência de Energia por Ressonância Förster é um mecanismo geral que descreve a transferência de energia entre dois cromóforos, os quais são a parte (átomo ou grupo de átomos) de uma entidade molecular, em que a transição eletrônica responsável por uma dada faixa espectral é, aproximadamente, localizada [38], sendo responsáveis pela cor da molécula. Também é chamada de Transferência de Energia de Ressonância de Fluorescência no caso particular em que se tem fluorescência [32].

A FRET tornou-se amplamente utilizado em todas as aplicações de fluorescência, incluindo diagnósticos médicos, análise de DNA e imageamento óptico [32]. O uso generalizado da FRET é devido às distâncias favoráveis para transferência de energia, que são tipicamente o tamanho de uma proteína ou a espessura de uma membrana. Além disso, a extensão da FRET é facilmente previsível a partir das propriedades espectrais dos fluoróforos. Se as propriedades espectrais dos fluoróforos permitirem FRET, ela ocorrerá e não será afetada significativamente pelas biomoléculas na amostra. Estas propriedades favoráveis permitem a concepção de experimentos baseados nos tamanhos e características estruturais conhecidos da amostra. A FRET é um fenômeno eletrodinâmico que pode ser explicado usando a física clássica. Este fenômeno ocorre entre uma molécula doadora (D) no estado excitado e uma molécula de receptora (A) no estado fundamental. As moléculas doadoras tipicamente emitem em comprimentos de onda mais curtos que se sobrepõem com o espectro de absorção da receptora. A transferência de energia ocorre sem o aparecimento de um fóton e é o resultado de interações de longo alcance do tipo dipolo-dipolo entre o doador e o receptor. O termo transferência de energia de ressonância (RET) é o mais utilizado, pois o processo não envolve a aparição de um fóton. A taxa de transferência de energia depende do grau de sobreposição espectral do espectro de emissão do doador com o espectro de absorção do receptor, o rendimento quântico do doador, da orientação relativa dos dipolos de transição do

doador e do receptor e da distância entre as moléculas doadoras e receptoras. A dependência da distância da RET permite a medição das distâncias entre doadores e receptores. A aplicação mais comum da RET é medir as distâncias entre dois locais em uma macromolécula. Tipicamente, uma proteína é marcada de forma covalente com um doador e um receptor, exemplificado na Figura 5.



*Figura 5: Transferência de energia por ressonância de fluorescência (FRET) para uma proteína com um único doador (D) e um receptor (A). Figura adaptada de [32].*

Por exemplo, em estudos sobre a estrutura proteica, o doador é muitas vezes um resíduo de triptofano [32]. No entanto, os doadores extrínsecos são muitas vezes utilizados devido à possibilidade de posicionar o doador em um local desejado e selecionar os pares D-A que são mais adequados para uma determinada aplicação. Se não houver um único doador e receptor, e se a distância D-A não se altera durante o tempo de vida do estado excitado, em seguida, a distância D-A pode ser determinada a partir da eficiência de transferência de energia. Essa eficiência pode ser determinada por meio de medições do estado estacionário da extensão do doador devido à supressão do receptor. A RET também é utilizada em estudos em que a distância D-A real não pode ser medida. Experimentos típicos deste tipo incluem a hibridização de DNA ou quaisquer reações de bioafinidade [32]. Se a amostra contém dois tipos de macromoléculas que são marcados individualmente com doador ou receptor, a associação das moléculas geralmente são observadas utilizando RET. A observação da RET é suficiente para medir o grau de ligação, mesmo sem o cálculo da distância D-A. Atualmente

as medições de estado estacionário são muitas vezes utilizadas para medir as interações de ligação [32]. As distâncias são geralmente obtidas a partir de medidas resolvidas no tempo. A transferência de energia de ressonância também é utilizada para estudar sistemas macromoleculares quando existe mais do que uma única molécula receptora perto de uma molécula doadora [32]. Esta situação ocorre com frequência para os conjuntos maiores de macromoléculas, ou quando se utilizam membranas, onde o receptor é um análogo lipídico livre difundido [32]. Mesmo com um único par D-A, pode haver mais do que uma única distância D-A, tal como para uma proteína desnaturada [32]. A extensão da transferência de energia também pode ser influenciada pela presença de difusão doador/receptor durante o tempo de vida do doador [32]. Embora a informação possa ser obtida a partir dos dados de estado estacionário, tais sistemas são usualmente estudados utilizando medidas resolvidas no tempo [32].

Um cromóforo doador, inicialmente em seu estado eletrônico excitado, transfere energia para um cromóforo receptor nas imediações, geralmente inferior a 10 nm, através do acoplamento dipolo-dipolo não radiativo [32]. Este mecanismo é chamado de “transferência de energia por ressonância de Förster”. Quando ambos os cromóforos são fluorescentes, o termo utilizado é “transferência de energia por ressonância de fluorescência”, embora a energia não seja realmente transferida por fluorescência. Este fenômeno é sempre uma transferência não-radiativa de energia, pois deve-se ao fenômeno de ressonância [32]. Então a taxa de transferência de energia  $k_T(r)$  é dada pela equação (1) [32],

$$k_T(r) = \frac{1}{\tau_D} \left( \frac{R_0}{r} \right)^6 \quad (1)$$

onde  $r$  é a distância entre o doador e o receptor,  $\tau_D$  é tempo de vida do doador na ausência de transferência de carga e  $R_0$  é o raio de Förster. Se a taxa de transferência é muito mais rápida do que a taxa de decaimento, então a transferência de energia será eficiente. Se a taxa de transferência é mais lenta do que a taxa de decaimento, então pouca transferência irá ocorrer durante o tempo de vida do estado excitado, e a RET será ineficiente.

A distância de Förster depende da integral de sobreposição do espectro de emissão doador com o espectro de absorção receptor e é a distância em que a eficiência da transferência de energia é de 50%, dada pela equação (2):

$$R_0^6 = \frac{9000 Q_0 (\ln 10) \kappa^2 J}{128 \pi^5 n^4 N_A} \quad (2)$$

onde  $\kappa$  é um fator de orientação de dipolo,  $n$  é o índice de refração médio,  $N_A$  é o número de Avogadro,  $J$  é a integral de sobreposição espectral e  $Q_0$  é a eficiência quântica de fluorescência do doador na ausência de receptor.

Quando há uma sobreposição (*overlap*) da emissão do doador com a absorção do receptor, como na Figura 6, a intensidade da emissão do segundo fluoróforo é aumentada devido à integral  $J$  na equação (2).

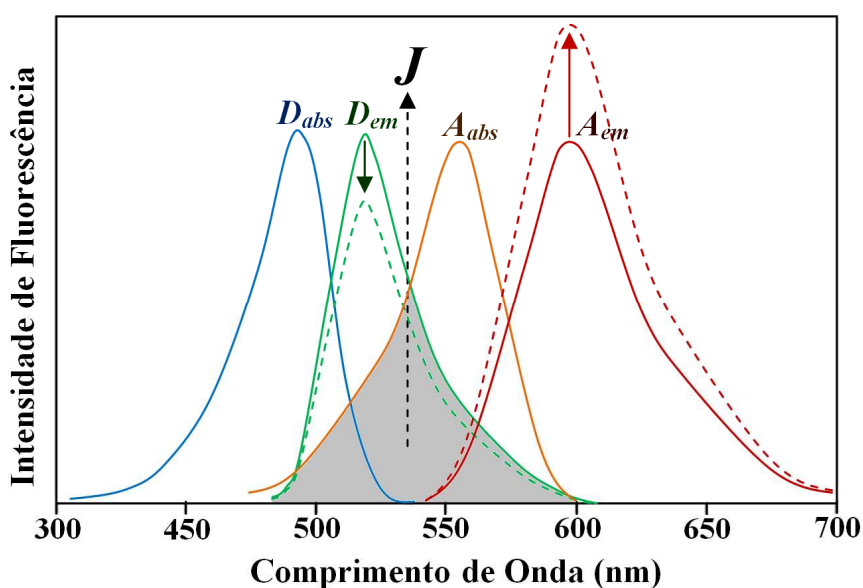


Figura 6: Espectros de absorção e emissão dos fluoróforos doadores D e dos receptores A. A região cinza indica a integral de sobreposição  $J$  da curva de emissão do doador e da absorção do receptor. Quando esta sobreposição ocorre há um decréscimo da absorção do doador (verde pontilhado) e um aumento da emissão do receptor (vermelho pontilhado).

A FRET é análoga à comunicação próxima de campo, em que o raio de interação é muito menor que o comprimento de onda da luz emitida. Na região de campo próximo, o cromóforo excitado emite um fóton virtual, que é imediatamente absorvido por um cromóforo receptor. Estes fótons virtuais não são detectáveis, uma vez que sua existência viola a conservação de energia. É também por este motivo que a FRET é conhecida como um mecanismo não-radioativo e também por ser uma transferência de energia a longa distância

( $\sim 100 \text{ \AA}$ ) [32]. A transferência de energia pode ser uma ferramenta para se obter informações sobre os estados excitados das moléculas e mecanismos de emissão, apresentado na Figura 7.

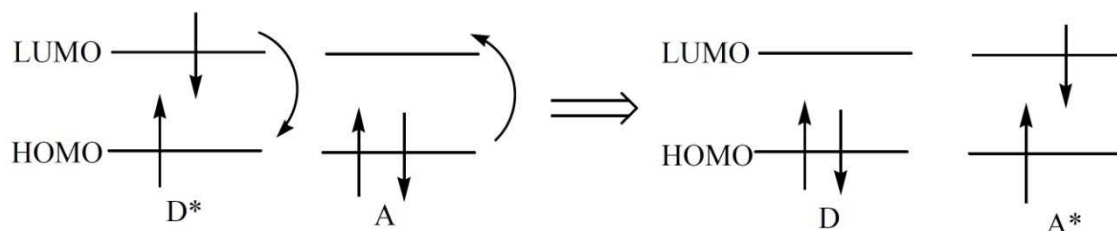


Figura 7: Mecanismo de transferência de energia do tipo Förster. Figura adaptada de [33].

Neste processo, a energia do estado excitado  $D^*$  é transferida para  $A$  enquanto  $D$  ainda está no estado excitado. Quando  $D$  retorna ao estado fundamental, esse promove um elétron de  $A$ , gerando um estado excitado de  $A^*$ .

No caso de uma transferência de energia por ressonância Dexter, como contra-exemplo, há troca de elétrons [39] e conseguinte supressão da fluorescência [32]. A teoria da transferência de energia é baseada no conceito de um fluoróforo como um dipolo oscilante, que pode trocar energia com o outro com dipolo com uma frequência de ressonância semelhante. Assim a RET é similar ao comportamento dos osciladores acoplados. No entanto, a transferência de energia radiativa é devido à emissão e reabsorção de fótons. A transferência radiativa depende de propriedades ópticas não moleculares da amostra, tais como o tamanho do recipiente da amostra, o comprimento do percurso óptico, as absorvâncias da amostra em determinados comprimentos de onda de excitação e de emissão, e do arranjo geométrico do caminho óptico na excitação e emissão.

A transferência de energia por ressonância contém informação molecular diferente daquelas obtidas a partir de experimentos realizados com diluição, reações de estado excitado, supressão de fluorescência ou experimentos de anisotropia de fluorescência. Esses outros fenômenos de fluorescência dependem de interações do fluoróforo com outras moléculas na superfície do solvente. Essas interações próximas são menos importantes para a transferência de energia, com exceção de seus efeitos sobre as propriedades espectrais do doador e receptor. As transferências de energia não-radiativas são eficazes a distâncias longas, e o solvente ou macromolécula têm pouco efeito sobre a eficiência de transferência de energia, que depende principalmente da distância D-A.

As equações que regem a FRET são obtidas através da Mecânica Quântica [39][40], determinando as energias envolvidas, campos e a eficiência deste fenômeno [32]. Então tem-se que a eficiência FRET é dada pela equação (3) [32]:

$$E = \frac{R_0^6}{R_0^6 + r^6} \quad (3)$$

A equação (18) mostra que a eficiência de transferência é fortemente dependente da distância D-A quando esta é próxima de  $R_0$ , como mostra a Figura 8.

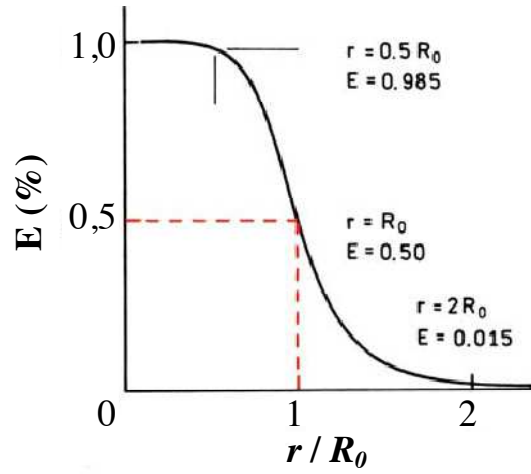


Figura 8: Dependência da eficiência de transferência de energia ( $E$ ) com a distância  $r$ , onde  $R_0$  é a distância de Förster. Figura adaptada de [32].

A eficiência aumenta rapidamente para 1 quando a distância D-A diminui e possui valor menor que  $R_0$ . Por outro lado, a eficiência de transferência diminui rapidamente para zero se  $r$  for maior que  $R_0$ . Isto ocorre porque  $E$  depende fortemente da distância  $r$ . A eficiência de transferência é medida utilizando a intensidade relativa de fluorescência do doador na ausência e na presença do receptor.

## 2.3 Supressão de fluorescência (*Quenching*)

A supressão de fluorescência (*quenching*) refere-se a qualquer processo que diminua a intensidade da fluorescência de uma determinada substância [32]. Vários processos podem resultar em extinção, como reações de transferência de energia de estados excitados, formação de complexos e *quenching* de colisão [32]. Além desses processos, a extinção pode ocorrer devido a propriedades ópticas da amostra. Como consequência, a diminuição da intensidade é fortemente dependente da pressão e temperatura [32]. Geralmente o *quenching* diminui a intensidade da fluorescência devido à uma outra molécula presente junto com o fluoróforo, tal que o comprimento de onda referente à absorção da molécula supressora de fluorescência (*quencher*) é muito parecida ou igual ao comprimento de onda de emissão do fluoróforo [32], apresentada na Figura 9.

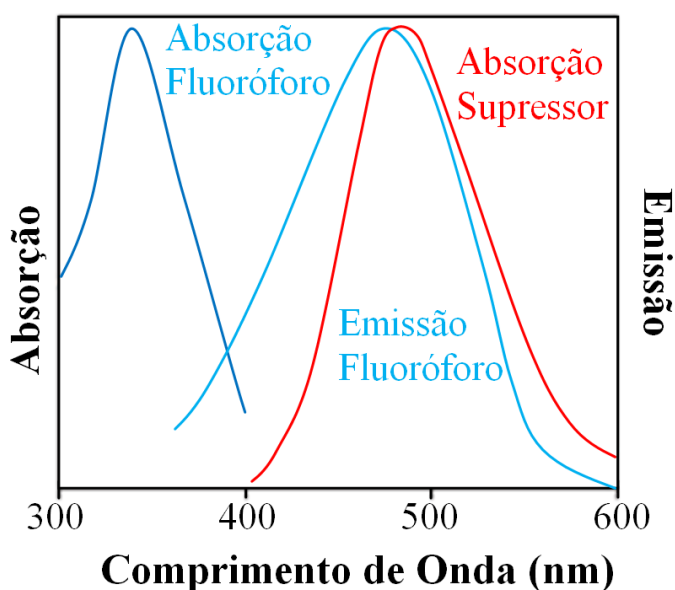


Figura 9: Espectro hipotético de absorção/emissão de um fluoróforo com a absorção do supressor.

O *quenching* tem sido amplamente estudado tanto como um fenômeno fundamental, como uma fonte de informação sobre os sistemas bioquímicos [32]. Estas aplicações bioquímicas de *quenching* são devido às interações moleculares resultantes nas mesmas, mostrando que não há a necessidade de haver um sistema com duas ou mais moléculas para que este fenômeno ocorra [32].



### 2.3.1 Supressão da fluorescência de colisão (*Collisional Fluorescence Quenching*)

Tanto o *quenching* estático quanto o dinâmico necessitam contato molecular entre o fluoróforo e o supressor de fluorescência, o *quencher*. No caso do *quenching* de colisão o *quencher* deve se difundir ao fluoróforo durante o tempo de vida no estado excitado [32]. Ao entrar em contato, o fluoróforo retorna para o estado fundamental, sem a emissão de um fóton. Geralmente o *quenching* ocorre quando há alguma alteração permanente na molécula, isto é, sem reação fotoquímica [32].

No *quenching* estático há a formação de um complexo entre o *quencher* e o fluoróforo, suprimindo a fluorescência e tornando este complexo não-fluorescente [32].

O fenômeno do *quenching* dinâmico resulta de uma expansão volumétrica da solução e aumento das distâncias entre as moléculas fluoróforas na solução [32].

Devido a efeitos quânticos, há uma transferência de energia não-radioativa, ocasionando a redução na emissão do fluoróforo [32]. Em muitos trabalhos é testada a influência da concentração de *quenchers* na emissão do polímero, como na Figura 10.

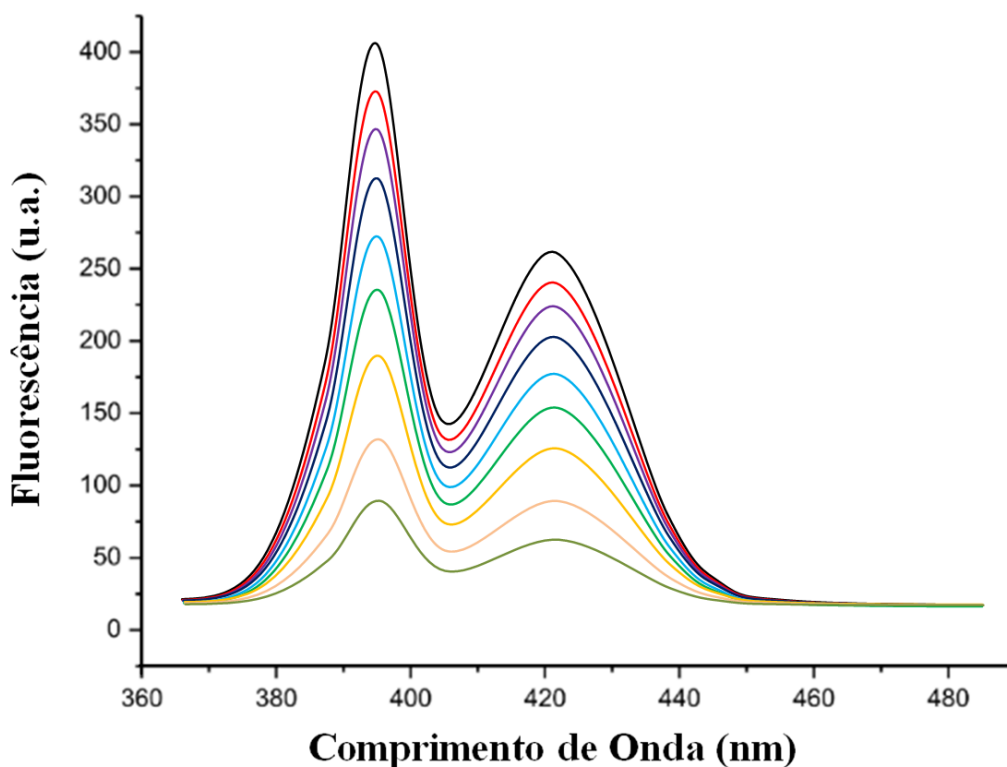


Figura 10: Exemplo hipotético da redução da intensidade de fluorescência com o aumento da concentração de supressores (*quenchers*).

Uma grande variedade de substâncias atua como supressores de fluorescência. Muitas vezes, o *quenching* está ligado diretamente ao conceito de agregados, que são estruturas moleculares que ocorrem em certos polímeros causando um empilhamento das cadeias, pois uma das características mais importantes para que se ocorra a supressão da fluorescência é a distância intermolecular, de modo que o contato molecular é um requisito para o *quenching*. Por consequência, estes empilhamentos influenciam na intensidade luminosa da emissão do fluoróforo [37].

Não cabe aqui demonstrar de onde parte-se para encontrar tais equações, pois são muito extensas, então se optou por apenas colocar as mais importantes e em suas formas finais.

*Quenching* de colisão da fluorescência é descrita pela equação de Stern-Volmer, dada por (4) [32]:

$$\frac{F_0}{F} = 1 + k_q \tau_0 [Q] = 1 + K_D [Q] \quad (4)$$

Nesta equação,  $F_0$  e  $F$  são as intensidades da fluorescência na ausência e presença de *quenchers*, respectivamente. A constante do *quenching* bimolecular é  $k_q$ ,  $\tau_0$  é o tempo de vida do fluoróforo na ausência de *quenchers* e  $[Q]$  a concentração de *quenchers*. A constante de *quenching* Stern-Volmer é dada por  $K_D = k_q \tau_0$ . Se o *quenching* é do tipo dinâmico, a constante de Stern-Volmer será representada por  $K_D$ , se houver um *quenching* estático a constante será descrita por  $K_{SV}$ . Os dados de *quenching* são geralmente apresentados como gráficos de  $F_0/F$  versus  $[Q]$ . Esta representação é devida ao fato de se esperar que  $F_0/F$  seja linearmente dependente com a concentração de *quenchers*. Um exemplo comparativo entre o *quenching* dinâmico e o *quenching* estático de um gráfico  $F_0/F$  versus  $[Q]$  com inclinação  $K_D$  é dado pela Figura 11.

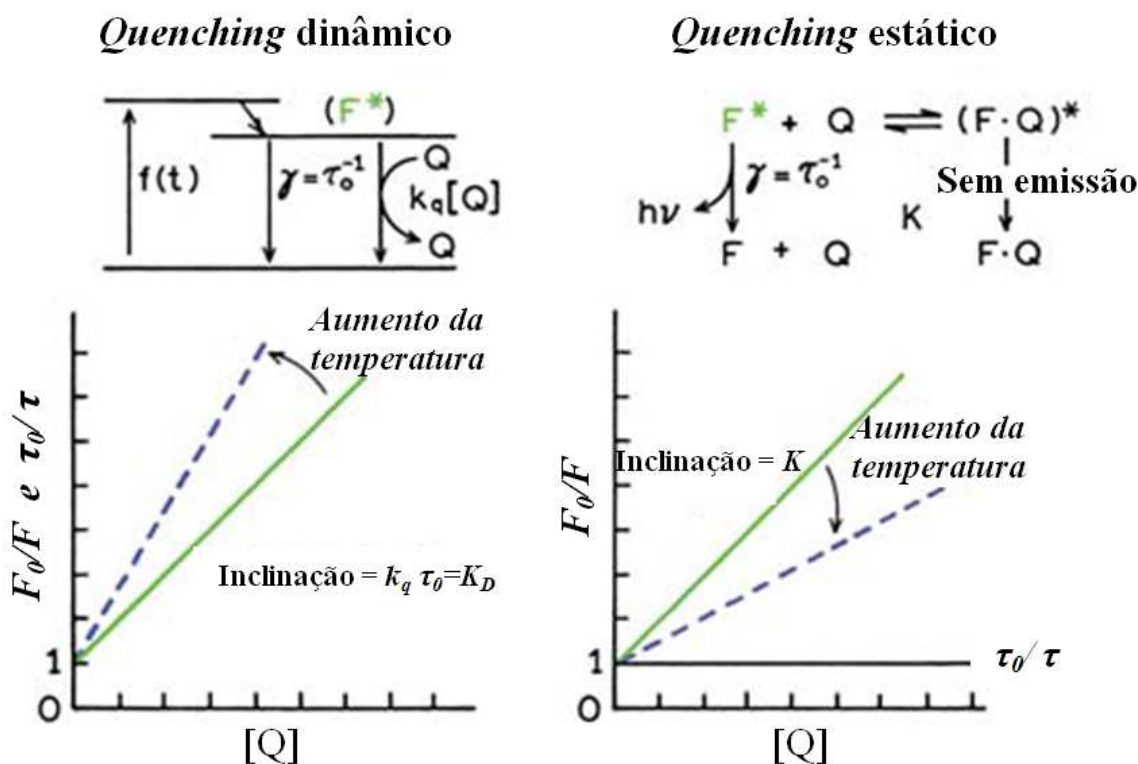


Figura 11: Comparação do *quenching* dinâmico e *quenching* estático. Figura adaptada de [32]).

Um gráfico linear de Stern-Volmer é geralmente indicativo de uma única classe de fluoróforos, todos igualmente acessíveis ao *quencher*. Se duas classes de fluoróforos estão

presentes e uma delas não é acessível pelo *quencher*, então os gráficos Stern-Volmer desviam da linearidade acima do eixo-x. É importante salientar que a observação de um gráfico Stern-Volmer linear não implica em *quenching* de colisão, e para distinguir se um *quenching* é estático ou dinâmico é necessário realizar um estudo da dependência com a temperatura [32]. Altas temperaturas resultam numa rápida difusão e, assim, uma grande quantidade de supressões por colisão. Mas as altas temperaturas também podem resultar na quebra de ligações fracas e então haverá um pequeno número de supressões estáticas [32].

## 2.4 Método computacional

Para os cálculos computacionais realizados nesta tese deve-se assumir algumas condições. Primeiramente assume-se que o estado fundamental da molécula é camada fechada, resultando em um estado singlete. Assim o spin total é nulo.

A função de onda do estado eletrônico fundamental da molécula é obtida utilizando Método de Hartree-Fock e o funcional B3LYP, que serão explicados *a posteriori* neste trabalho.

Também é usada na descrição da estrutura eletrônica da molécula a aproximação de Born-Oppenheimer, a qual consiste no fato de que os núcleos atômicos são mais massivos que os elétrons [41]. Desta forma, os tempos característicos para os movimentos nucleares são muito maiores que os tempos característicos dos movimentos eletrônicos, o que faz com que os núcleos sejam considerados estáticos. Portanto, a estrutura eletrônica da molécula dependerá somente das coordenadas nucleares.

### 2.4.1 Cálculos *ab initio* e semiempírico

Para descrever o comportamento eletrônico em moléculas, necessita-se de um formalismo rigoroso que descreva a natureza quântica dos elétrons, dos núcleos e suas interações. Estes formalismos devem estar de acordo com a química experimental; para isso é necessário que haja o mínimo de aproximações nos cálculos. Uma abordagem bastante utilizada é conhecida como *ab initio* (do latim, primeiros princípios) [42]. Esta abordagem consiste em fazer

aproximações para calcular a equação de Schrödinger sem o auxílio de parâmetros empíricos e permite que as diversas propriedades de um material que dependem da energia total do sistema ou de diferenças de energia possam ser determinadas de modo satisfatório.

Por ser um cálculo baseado na resolução direta da equação de Schrödinger, ele é versátil, podendo ser utilizado para o cálculo de diversas propriedades e tipos de moléculas diferentes. Todavia é um tipo de cálculo que envolve um custo computacional alto. Para alguns tipos de moléculas, principalmente polímeros, este método torna-se ainda mais dispendioso, ao passo que se devem utilizar algumas técnicas para contornar este problema como, por exemplo, o cálculo de moléculas análogas com número menor de átomos. No entanto, para alguns tipos de moléculas este problema pode ser contornado através do uso de métodos semiempíricos. Os cálculos semiempíricos podem ser de extrema utilidade no estudo de sistemas com um número grande de átomos e, também, se forem utilizados em conjunto com uma abordagem de cálculos *ab initio*.

Os cálculos semiempíricos são caracterizados pelo uso de parâmetros derivados de dados experimentais a fim de simplificar a aproximação da equação de Schrödinger [42]. Os métodos mais conhecidos são AM1, PM3 e MNDO [43]. Outro cálculo semiempírico conhecido é o ZINDO, o qual é uma variação de outro cálculo conhecido como INDO [44]. O ZINDO é utilizado para o cálculo de energias do estado excitado para n-orbitais ocupados e n-orbitais virtuais, o qual foi desenvolvido por Michael Zerner [43]. Este método é mais abrangente que o INDO, pois realiza cálculo de diferenciais de sobreposição (*overlap*) eletrônico, abrangendo todos elementos da tabela periódica [43]. No presente trabalho ele é utilizado para o cálculo de absorção na região do UV-Vis.

O tratamento *ab initio* implica, primeiramente, na consideração de todos os elétrons, e se utiliza de um operador Hamiltoniano exato não-relativístico, dado por (5):

$$\hat{H} = -\frac{1}{2m} \sum_{A=1}^M \nabla_i^2 - \frac{1}{2} \sum_{i=1}^N \nabla_i^2 + \sum_{A=1}^M \sum_{B>A}^M \frac{Z_A Z_B}{r_{AB}} - \sum_{A=1}^M \sum_{i=1}^N \frac{Z_A}{r_{iA}} + \sum_{i=1}^N \sum_{j>1}^N \frac{1}{r_{ij}} , \quad (5)$$

onde os índices  $A, B$  e  $i, j$  denotam núcleos e elétrons, respectivamente.  $N$  é o número de elétrons e  $M$  o número de núcleos atômicos. Os números atômicos dos átomos  $A$  e  $B$  são  $Z_A$  e  $Z_B$ , respectivamente. O termo  $r_{ij}$  representa a distância entre os elétrons  $i$  e  $j$ . O termo  $r_{iA}$  representa a distância entre o elétron  $i$  e o núcleo  $A$ . Já o termo  $r_{AB}$  representa a distância entre os núcleos  $A$  e  $B$ . Na equação (5), o primeiro termo é o operador de energia cinética dos núcleos, o segundo termo é o operador de energia cinética dos elétrons, o terceiro e o último

termos representam, respectivamente, a repulsão coulombiana núcleo-núcleo e elétron-elétron e o quarto termo representa a atração coulombiana entre elétrons e núcleos.

Alguns tratamentos *ab initio* usam funções de base do tipo Gaussianas (combinação linear de Gaussianas primitivas) e calculam explicitamente todas as integrais necessárias [41].

## 2.4.2 A Aproximação de Born-Oppenheimer

A evolução do estado quântico de um sistema físico é descrito pela equação de Schrödinger, proposta pelo físico austríaco Erwin Schrödinger em 1925. Na química quântica, o objetivo central é a obtenção de soluções da equação de Schrödinger para a determinação precisa de propriedades de sistemas atômicos e moleculares. Um método muito popular e capaz de fornecer uma boa solução para o problema de muitos elétrons é o método de Hartree-Fock (HF). O método HF não se restringe apenas a átomos, podendo ser utilizado em outros sistemas tais como moléculas ou sólidos. A equação de Schrödinger não possui solução analítica para sistemas moleculares. Assim, são necessárias aproximações para viabilizar o seu emprego em sistemas reais. Uma das aproximações mais importantes é a de Born-Oppenheimer [44]. A aproximação Born-Oppenheimer permite separar o hamiltoniano do sistema em duas partes: uma, devido ao movimento nuclear, e a outra parte, relacionada ao movimento eletrônico. Como a razão entre as massas do elétron e do núcleo é suficientemente pequena, os núcleos não acompanham as rápidas mudanças na trajetória dos elétrons e podem ser considerados fixos. Assim, considera-se que os elétrons movem-se em campos com o núcleo fixo.

A resolução de uma equação

$$\hat{H}\psi(r_i R_A) = E\psi(r_i R_A) \quad (6)$$

utilizando o hamiltoniano dado por (6) é deveras complicada. Desta forma, uma boa aproximação é considerar os núcleos fixos, fazendo com que o primeiro termo de (6) seja desconsiderado, já que não haverá energia cinética nos núcleos. Com isso, os elétrons passam a se mover com um campo gerado por M cargas pontuais fixas e positivas.

Para uma dada configuração nuclear o terceiro termo do Hamiltoniano (5) é uma constante e podemos escrever (7):

$$\hat{H}_{el}\psi_{el} = E_{el}\psi_{el} \quad , \quad (7)$$

onde

$$\hat{H}_{el} = -\frac{1}{2} \sum_{i=1}^N \nabla_i^2 - \sum_{A=1}^M \sum_{i=1}^N \frac{Z_A}{r_{iA}} + \sum_{i=1}^N \sum_{j>1}^N \frac{1}{r_{ij}} \quad . \quad (8)$$

Portanto, a solução da equação de Schrödinger eletrônica  $\psi_{el}$  dependerá parametricamente das coordenadas dos núcleos e explicitamente das coordenadas eletrônicas. A energia eletrônica  $E_{el}$  também terá uma dependência paramétrica das coordenadas nucleares, sendo assim as funções  $\psi_{el} = \psi_{el}(r_i, R_A)$  e  $E_{el} = E_{el}(R_A)$ .

Para calcular a energia total na aproximação de núcleos fixos devemos somar à energia eletrônica  $E_{el}$  o valor da constante de repulsão coulombiana nuclear. Logo a energia total será dada por (9):

$$E_{tot} = E_{el} + \sum_{A=1}^M \sum_{B>A}^M \frac{Z_A Z_B}{r_{AB}} \quad (9)$$

É possível resolver aproximadamente a parte do movimento nuclear, se a parte eletrônica estiver resolvida, supondo que os elétrons, que são muito mais rápidos que os núcleos, ajustam seu estado instantaneamente à configuração nuclear. Desta forma, a parte eletrônica pode ser trocada por um valor médio, que será a energia eletrônica  $E_{el}$ . Assim, o Hamiltoniano nuclear será dado por (10):

$$\hat{H}_{nuc} = -\sum_{A=1}^M \frac{1}{2m} \nabla_i^2 + \sum_{A=1}^M \sum_{B>A}^M \frac{Z_A Z_B}{r_{AB}} + E_{el} \quad (10)$$

Na aproximação de Born-Oppenheimer os núcleos sofrem influência de um campo médio gerado por elétrons e a energia total  $E_{tot}$  funciona como uma energia potencial para o movimento nuclear. Então a equação de Schrödinger para o movimento nuclear é escrita como (11):

$$\hat{H}_{nuc}\psi_{nuc}(R_A) = E\psi_{nuc}(R_A) . \quad (11)$$

Na equação (7)  $E$  é a energia total molecular na aproximação Born-Oppenheimer, pois o Hamiltoniano nuclear envolve os operadores referentes à energia cinética e potencial nuclear, adicionado à energia eletrônica. Assim, a função de onda total é dada por (12):

$$\psi(r_i, R_A) = \psi_{el}(r_i, r_A)\psi_{nuc}(R_A) , \quad (12)$$

que é um produto direto entre as autofunções do Hamiltoniano eletrônico e nuclear.

A equação de Schrödinger eletrônica não é separável devido à existência do termo de repulsão eletrônica  $1/r_{ij}$ , complicando a obtenção de uma solução exata. Para contornar este problema, Hartree em 1928 [45] propôs, baseado no princípio variacional, o método de campo auto-consistente (*self consistente field*, SCF), que resolve de maneira iterativa a equação de Schrödinger eletrônica. Neste método cada elétron está sob a influência de um potencial atrativo devido ao núcleo e da interação repulsiva média relativa dos demais  $N-1$  elétrons [45]. A função de onda eletrônica é dada por um produto de funções espaciais do tipo  $\Psi(r_1, r_2, \dots, r_N) = \phi_i(r_1)\phi_j(r_2) \dots \phi_k(r_N)$ , onde o que se busca são as funções  $\phi_i(r_i)$  as quais minimizam o funcional  $\frac{\langle \Psi | \hat{H} | \Psi \rangle}{\langle \Psi | \Psi \rangle}$ . Entretanto, este método não leva em consideração o *spin* eletrônico e nem o fato de que a função de onda total multieletrônica deve ser antissimétrica com respeito à troca de coordenadas espacial e de *spin* entre dois elétrons quaisquer. Porém, estas considerações devem ser feitas para que a função de onda descreva de forma precisa as propriedades de sistemas atômicos e moleculares. Em 1930, Fock acrescentou ao método de Hartree o *spin* eletrônico e a antissimetrização da função de onda total, no método conhecido como Hartree-Fock [46]. No método *HF* a função de onda molecular (ou atômica) total é representada por um único determinante de Slater [47]

### 2.4.3 Método de Hartree-Fock

O método de Hartree-Fock é um método de aproximação para a determinação da função de onda e energia do estado fundamental de um sistema quântico de muitos corpos [41]. A função de onda do estado eletrônico fundamental da molécula pode ser obtida através de um



determinante de Slater formado por um conjunto de *spin*-orbitais (funções que descrevem as probabilidades espacial e de *spin* do elétron) [41], já que existe uma função de onda para cada elétron e a composição anti-simétrica destas forma a função de onda total do sistema de  $N$  elétrons.

Desta maneira, uma forma de escrever a função de onda é através do determinante de Slater, dado por (13):

$$\Psi(\vec{x}_1, \vec{x}_2, \dots, \vec{x}_N) = (N!)^{-1/2} \begin{vmatrix} \chi_i(\vec{x}_1) & \chi_j(\vec{x}_1) & \dots & \chi_k(\vec{x}_1) \\ \chi_i(\vec{x}_2) & \chi_j(\vec{x}_2) & \dots & \chi_k(\vec{x}_2) \\ \vdots & \vdots & & \vdots \\ \chi_i(\vec{x}_N) & \chi_j(\vec{x}_N) & \dots & \chi_k(\vec{x}_N) \end{vmatrix}, \quad (13)$$

onde  $(N!)^{-1/2}$  é o fator de normalização, cada  $\chi(\vec{x}_i)$  é um *spin* orbital dependente de duas funções, uma espacial e uma de *spin* e  $\Psi(r_1, r_2, \dots, r_N)$  é a função de onda eletrônica no estado fundamental de uma molécula. Assim, como cada *spin* orbital depende de duas funções,  $\varphi(\vec{r}_i)$  é a função espacial e as funções de *spin* são dadas por  $\alpha(\omega)$  e  $\beta(\omega)$  com autovalores de  $S_z$  iguais a  $+\frac{1}{2}$  e  $-\frac{1}{2}$ , respectivamente. Devido à ortonormalidade das funções de *spin*,

$$\int \alpha^*(\omega)\alpha(\omega)d\omega = \int \beta^*(\omega)\beta(\omega)d\omega = 1 \quad (14)$$

e

$$\int \alpha^*(\omega)\beta(\omega)d\omega = \int \beta^*(\omega)\alpha(\omega)d\omega = 0, \quad (15)$$

pode-se construir as funções dos *spin* orbitais, dadas por (16) e (17):

$$\chi(\vec{x}_i) = \varphi(\vec{r}_i)\alpha(\omega) \quad (16)$$

e

$$\chi(\vec{x}_i) = \varphi(\vec{r}_i)\beta(\omega). \quad (17)$$

Para cada função de *spin*  $\alpha(\omega)$  e  $\beta(\omega)$ , pode-se fazer uma aproximação tal que a função espacial  $\varphi(\vec{r}_i)$  é a mesma para cada função *spin* orbital. Esta aproximação é conhecida como Hartree-Fock restrito (*RHF*) [41]. Esta é uma das aproximações utilizadas no presente trabalho. A seguir será apresentada uma técnica também amplamente utilizada na literatura e preferencialmente utilizada para os cálculos do LaPPS40, flavonóides do *S. nitens*, quercetina e sakuranetina, o DFT.

## 2.4.4 Teoria do Funcional de Densidade (DFT)

A Teoria do Funcional da Densidade (DFT - *Density Functional Theory*) é uma importante teoria para o estudo de estrutura eletrônica de sólidos e moléculas. Em décadas passadas, alguns problemas que tradicionalmente eram tratados por métodos Hartree-Fock e pós-Hartree-Fock, agora são tratados utilizando-se a DFT. Em alguns casos isto possibilita melhores concordâncias com os dados experimentais disponíveis. Com esta teoria, em princípio exata [48], pode-se estudar sistemas de tamanhos moderados a tamanhos grandes com uma precisão química aceitável e menor custo computacional. Uma das maneiras de reduzir o custo computacional é diminuir o número de coordenadas de integração. A função de onda de  $n$ -elétrons depende de  $3N$  coordenadas ( $x, y, z$  de cada elétron). Por outro lado, a densidade eletrônica  $\rho$ , independente do número de elétrons envolvidos, depende apenas de três coordenadas  $x, y, z$  [49]. Por se tratar de um método com alto interesse na área de estrutura eletrônica de sólidos e moléculas, vários trabalhos têm abordado o desenvolvimento da DFT desde seu aparecimento, em 1964, quando foram publicados os teoremas de Hohenberg e Kohn. Algumas abordagens *ab initio* começam com a aproximação Hartree-Fock, em que as equações são resolvidas primeiro para obter-se *spin*-orbitais, que podem ser utilizados para construir funções de estado. Atualmente, esses métodos são largamente utilizados pelos químicos quânticos [50], apesar de possuírem algumas limitações. Uma dessas limitações é a dificuldade computacional, devido ao termo de troca e correlação, de realizar cálculos precisos com conjuntos de bases grandes em moléculas contendo muitos átomos. Uma alternativa aos métodos *ab initio* que vem crescendo em popularidade na última década é a DFT. Ao contrário dos métodos *ab initio*, que usam funções de estado, a DFT usa o conceito de densidade de probabilidade eletrônica. Geralmente a DFT demanda menos tempo computacional comparado a outros métodos que também consideram correlação

eletrônica. Quando utilizada para fazer cálculos em moléculas de cem ou mais átomos esta teoria se mostra mais eficiente.

Na DFT a idéia básica é que a energia de um sistema eletrônico pode ser escrita em termos da densidade de probabilidade eletrônica total,  $\rho$  [50][51]. Para um sistema de  $n$ -elétrons,  $\rho(r)$  denota a densidade eletrônica total em um ponto  $r$  do espaço. A energia eletrônica  $E$  é um funcional da densidade eletrônica, representada como  $E[\rho]$ , tal que para uma dada função  $\rho(r)$ , existe uma única energia correspondente  $E$ . O nome “funcional” vem do fato de que a energia depende de uma função, que por sua vez depende de variáveis, ou seja,  $E[\rho(r)]$ . No caso dos métodos baseados em função de onda, a energia também é um funcional, pois depende da função de onda ( $E[\psi(r)]$ ). O conceito de um funcional de densidade para energia foi a base de alguns modelos úteis, tal como o método de Thomas-Fermi, que surgiu em 1920, a partir do trabalho de E. Fermi e L. H. Thomas. No entanto, apenas após 1964 uma prova final foi dada para o fato de que a energia e todas as outras propriedades eletrônicas do estado fundamental são unicamente determinadas pela densidade eletrônica [52]. Infelizmente, os teoremas de Hohenberg-Kohn não nos dizem a forma com a qual o funcional de energia varia com a densidade, afirmam apenas que tal funcional existe e é único [53]. Estes teoremas podem ser provados com algumas relações quânticas e, essencialmente, o teorema variacional [53] (os quais serão apresentados na seção Apêndice do presente trabalho). O próximo grande passo no desenvolvimento da DFT surgiu com a derivação por Kohn e Sham de um conjunto de equações de  $\rho(r)$  [54], que tornou a DFT útil.

Em Química Quântica, para o estudo de moléculas os métodos mais utilizados são os métodos híbridos, contendo uma mistura da Aproximação do Gradiente Generalizado (GGA - *Generalized Gradient Approximation*) com Hartree-Fock. Estes métodos híbridos têm uma precisão mais elevada do que muitos dos métodos tradicionais, mantendo, assim, uma grande simplicidade computacional, o que permite a sua aplicação em sistemas de grande complexidade. Um funcional híbrido mistura o funcional de energia de troca com os funcionais de troca e correlação de gradiente generalizado. Neste trabalho foi utilizado o funcional híbrido B3LYP, que será apresentado brevemente na seção a seguir.

### 2.4.4.1 Funcional híbrido B3LYP

Um dos funcionais utilizados na literatura para cálculos moleculares é o B3LYP. Este funcional é um tipo de aproximação conhecido como funcional híbrido, pois envolve funcionais de troca e correlação na teoria do funcional de densidade (DFT - *Density Functional Theory*) [30][43].

A teoria de Hartree-Fock também inclui um termo de troca como parte de sua formulação [43]. Em 1988, Becke formulou funcionais que incluem uma mistura de Hartree-Fock e troca juntamente com correlação em DFT, definindo a energia como (18):

$$E_{xc}^{hybrid} = c_{HF}E_x^{HF} + c_{DFT}E_{xc}^{DFT}, \quad (18)$$

onde  $c_{HF}$  e  $c_{DFT}$  são constantes.

O funcional híbrido mais conhecido é o “*Beck’s three-parameter formulation*” ou simplesmente B3LYP [44], que pode ser definido pela expressão (19):

$$E_{xc}^{B3LYP} = E_x^{LDA} + c_0(E_x^{HF} - E_x^{LDA}) + c_x\Delta E_x^{B88} + E_c^{VWN3} + c_c(E_c^{LYP} - E_c^{VWN3}). \quad (19)$$

Os termos *VWN* são termos de correção propostos por Vosko, Wilk e Nusair, *LYP* por Lee, Yang e Parr, *B88* por Becke (em 1988), *HF* por Hartree e Fock e *LDA* é uma aproximação de densidade local (*local-density approximation*) [43]. Os  $c_0$ ,  $c_x$  e  $c_c$  são constantes.

No funcional B3LYP, os valores dos parâmetros são os especificados por Becke, o qual determinou as energias apropriadas, potenciais de ionização, afinidades de prótons e energias atômicas [43].

## 3 Materiais e métodos

### 3.1 Experimental

Para as medidas de espectrometria UV–Vis foi utilizado um espectrômetro *Shimadzu* modelo NIR 3101.

A fluorescência de estado estacionário foi medida com um espectrômetro RF5301-PC da *Shimadzu* usando cubetas quadradas de 1 cm para as soluções. A faixa espectral do espectro e excitação a ser analisada foi 250–500 nm e para o espectro de emissão foi de 300 nm a 650 nm.

A emissão resolvida no tempo foi feita em um instrumento da *Edinburg Analytical Instruments*, modelo F900, o qual usa a técnica de contagens de um fóton. Este possui *lasers* pulsados de diodo com largura de pulso de 1 ns à meia altura e um detector MCP-PMT.

Foi utilizado um DLS (*Dynamic Light Scattering*) da Microtrac<sup>®</sup> para averiguar o tamanho médio das nano-partículas de ouro.

As imagens de microscopia foram feitas com um microscópio eletrônico de varredura de bancada *Phenom FEI Desktop*, o qual opera a 5 kV.

A haste seca da planta foi analisada com Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV) utilizando um VEGA3 TESCAN operando a 30kV.

Os resultados 3D de rugosidade e ondulação típica foram obtidos utilizando três varreduras, um normal a superfície, um a +5° e outro a -5°, da mesma área selecionada com o software ALICONA MeX.

A espectroscopia de fotoelétrons excitados por raios-X (XPS - *X-ray Photoelectron Spectroscopy*) foi realizada com um sistema VG *Microtech* ESCA 300 com anodo de raio-x de Al, um analisador de energia hemisférico de 250 mm, 9 detectores *channeltron* e um vácuo de base de  $3 \times 10^{-10}$  mbar. Este equipamento possui uma resolução de 0,8 eV.

A Microscopia de Fluorescência foi feita com um *Olympus* DX51 com detector DP72, utilizando filtros *Olympus* U-MWU2, U-MWB2, U-MWG2, U-N31004, U-N31005 e U-M00050.

Também foram feitas medidas de transmitância e refletância óptica e Espectroscopia de absorção/emissão com um espectrômetro *Ocean Optics* USB2000, com resolução ótica de 0,3 nm a 10 nm de largura à meia altura, dependendo da grade e do tamanho da abertura de

entrada. O detector possui um alcance de 200 nm a 1100 nm. O esquema do arranjo óptico de transmitância/absorbância e fluorescência podem ser vistos nas Figura 12 e Figura 13.

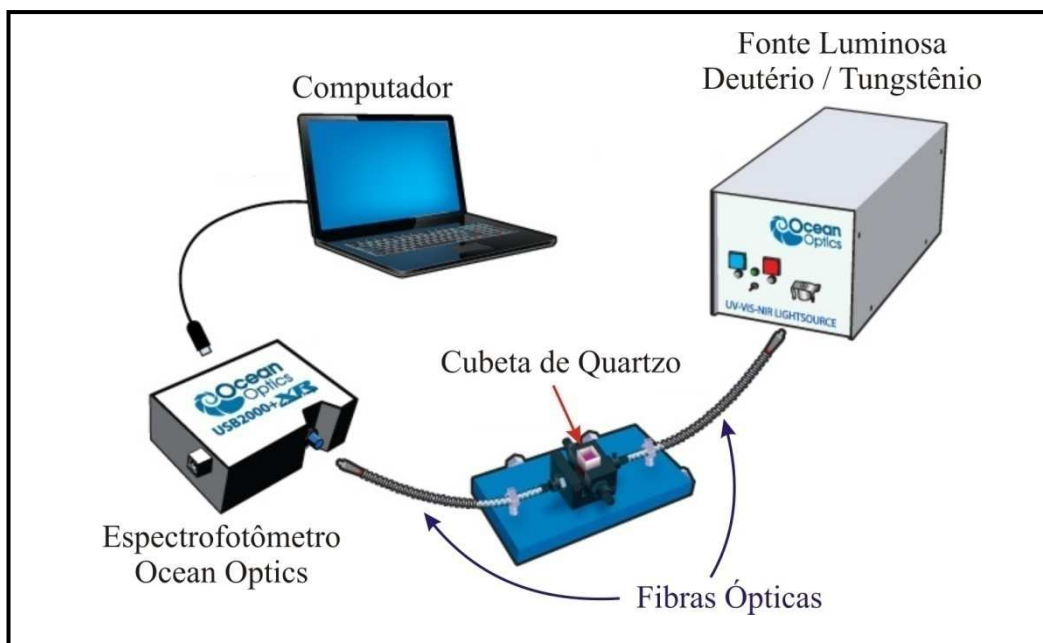


Figura 12: Esquema da montagem do arranjo óptico para medida de transmitância/absorbância.

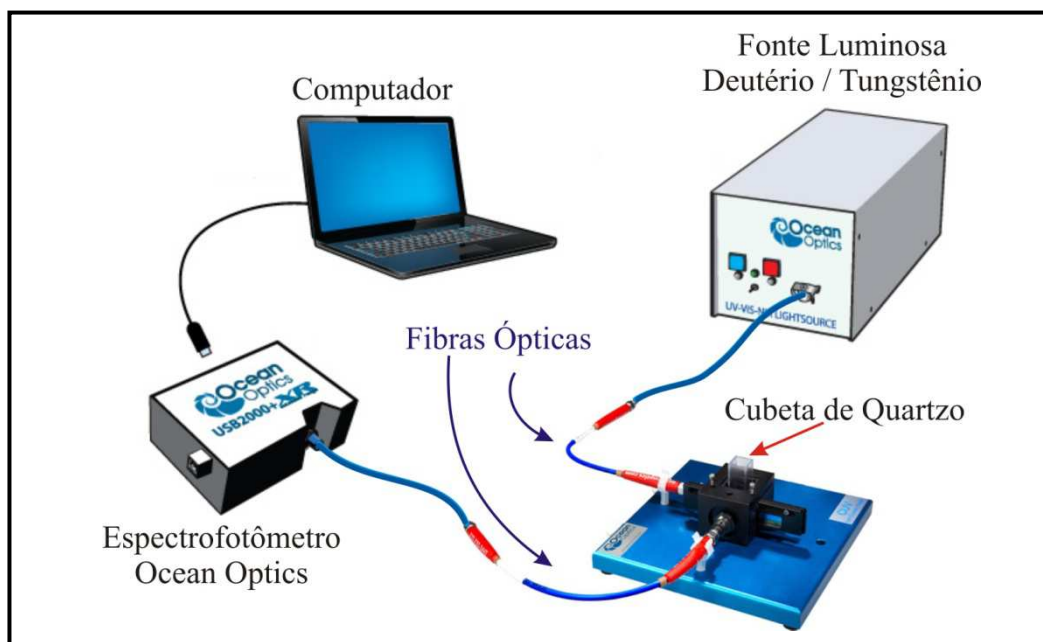


Figura 13: Esquema da montagem do arranjo óptico para medida de fluorescência.

Para a excitação da quercetina e sakuranetina foi utilizado um laser de nitrogênio da LTB *Lasertechnik Berlin* modelo MNL 100, com largura de pulso à meia altura de 3 ns.

Para as medidas de refletância foi utilizado um goniômetro caseiro, empregando laser diodos RGB (*Red Green Blue*) operando em 650, 532 e 405 nm, respectivamente, e o espectrômetro *Ocean Optics* USB2000 citado anteriormente. Para estas medições as hastes foram fixadas sobre um substrato plano com fita-adesiva.

## 3.2 Teórico

As propriedades eletrônicas e geométricas de alguns oligômeros com fluoreno e grupos benzotiazol foram estudadas utilizando métodos *ab initio* e semi-empíricos, assim como os 8 flavonóides encontrados na haste do capim dourado e os 2 flavonóides comerciais estudados no presente trabalho, a quercetina e a sakuranetina. Estes cálculos foram realizados em um *cluster* do CPD / DAFIS na UTFPR (Universidade Tecnológica Federal do Paraná) montado com recursos do INCT – Diagnósticos para Saúde Pública.

Primeiramente, é criado um arquivo de entrada (*input*) com o método utilizado, coordenadas de cada átomo da molécula e a sua multiplicidade. A geometria do monômero do LaPPS40 foi otimizada com o método Hartree-Fock com conjuntos de base 3-21G e 6-31G. Em seguida, a molécula foi otimizada com a DFT com o funcional B3LYP. Esta sequência de otimizações geram estados fundamentais próximos aos valores obtidos experimentalmente na otimização de polímeros conjugados [14,15]. Estas simulações foram realizadas utilizando o pacote GAUSSIAN 09 [44]. A segunda etapa foi construir o dímero a partir da geometria otimizada do monômero. A sequência de otimizações foi repetida para o dímero até o hexâmero. Finalmente, a simulação do espectro de absorção óptica do LaPPS40 foi realizada por meio de um método semiempírico ZINDO (*Zerner's Intermediate Neglect of Differential Overlap*) do pacote do GAUSSIAN 09. As energias de HOMO (*highest occupied molecular orbital*) e LUMO (*lowest unoccupied molecular orbital*) assim como as representações gráficas das mesmas também foram feitas com o auxílio do programa GAUSSIAN 09.

A geometria das 8 moléculas de flavonóides contidas na haste do capim dourado, a quercetina e a sakuranetina foram otimizadas seguindo o mesmo procedimento descrito

acima, assim como os cálculos do espectro de absorção óptica dos flavonóides, das energias de HOMO e LUMO e as representações gráficas das mesmas.

### 3.2.1 Exemplo de arquivo de entrada

A Figura 14 exemplifica um arquivo de entrada para a molécula de  $C_2H_4O$  (etanal ou acetaldeído) [42].

| # RHF/3-21G Opt                                    |   |      |   |       |   |        |
|--|---|------|---|-------|---|--------|
| Acetaldehyde (H eclipsing O) HF/3-21G optimization |   |      |   |       |   |        |
| 0  | 1 |      |   |       |   |        |
| C1   |   |      |   |       |   |        |
| C2   | 1 | 1.52 |   |       |   |        |
| O3   | 1 | 1.22 | 2 | 120.0 |   |        |
| H4   | 2 | 1.09 | 1 | 109.5 | 3 | 0.0    |
| H5   | 2 | 1.09 | 1 | 109.5 | 3 | 120.0  |
| H6   | 2 | 1.09 | 1 | 109.5 | 3 | -120.0 |
| H7   | 1 | 1.08 | 2 | 120.0 | 3 | 180.0  |

Figura 14: Exemplo de input para a molécula de  $C_2H_4O$  [42].

Na primeira linha do arquivo (*input*), RHF representa o método utilizado durante a modelagem. Neste caso foi aplicado o método Hartree-Fock Restrito. Quando é utilizado o método DFT, substitui-se a sigla do método pelo funcional escolhido. A função de base escolhida é a 3-21G. A terceira linha é um resumo da simulação, criado pelo próprio usuário, que não afeta em nada a modelagem. A quinta linha mostra a carga da molécula e a multiplicidade. No caso 0 1, a carga da molécula é 0 e a multiplicidade é 1. As próximas linhas indicam as coordenadas da molécula. Se os átomos da molécula forem numerados de acordo com a Figura 15, pode-se escrever as coordenadas em função das posições, ângulos e diedros relativos (coordenadas internas).



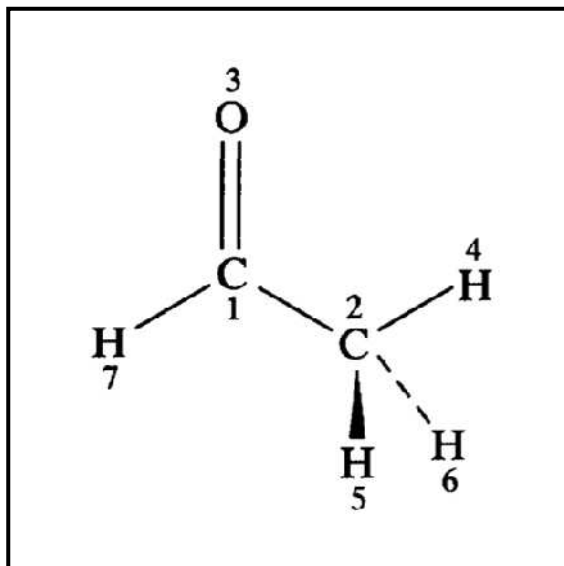


Figura 15: Conformação utilizada para a molécula de  $C_2H_4O$ . Figura extraída de [42].

Desta forma, ao escrever

**C1**

**C2    1       1.52**

quer-se dizer que o átomo de carbono número 2 está ligado ao átomo de carbono número 1 por uma distância de 1,52 Å.

Ao escrever:

**C2    1       1.52**

**O3    1       1.22            2       120.0**

quer-se dizer que o átomo de oxigênio está ligado ao átomo de carbono número 1 por uma distância de 1,22 Å. Este átomo de oxigênio também faz um ângulo de 120,0° com o carbono número 2. O quarto átomo é o hidrogênio, e, para localizar o mesmo, precisa-se definir o ângulo diédrico, escrevendo:

**O3    1       1.22            2       120.0**

**H4    2       1.09            1       109.5            3       0.0**

Assim, o átomo de hidrogênio estará ligado aos átomos de carbono número 2 por uma distância de 1,09 Å, que faz um ângulo de 109,5° com o átomo de carbono número 1, e que ainda faz um diedro de 0,0° com o átomo de oxigênio número 3.

As representações continuam até que todas as coordenadas de todos os átomos sejam definidas.

## 4 Resultados e Discussão

Nesta seção serão descritos todos os processos envolvidos, teórico e experimental. Nele serão apresentados os resultados obtidos para o polímero LaPPS40 e os flavonóides do Capim-dourado publicado em [55], Quercetina e Sakuranetina, e resultados com adição das nanopartículas de ouro, as quais mostraram-se supressoras de fluorescência, fundamentais para a marcação em testes diagnósticos.

### 4.1 LaPPS40

Assim como outros copolímeros de sua família, o poli[9, 9-bis(3'-(t-butil propanoato))fluoreno-co-4,7-(2,1,3-benzotiadiazol)] (LaPPS40) possui propriedade fotoluminescente. Esse copolímero foi obtido através da rota Suzuki [28] (representado pela Figura 16) em parceria com o Laboratório de Polímeros Paulo Scarpa (LaPPS) da UFPR, suas propriedades optoeletrônicas foram estudadas a fundo com o intuito de utilizá-lo em testes diagnósticos e, futuramente, em possíveis outras aplicações que envolvessem fluorescência ou transferência de carga.

A fim de compreender a físico-química do copolímero LaPPS40, primeiramente foram realizadas medidas em microscópio eletrônico de varredura, cromatografia por permeação em gel, Ressonância Magnética Nuclear (RMN), análise térmica, voltametria cíclica, espectroscopia de fotoelétrons excitados por raio-x (XPS), difração de raio-x e espectroscopia UV-Vis apenas do copolímero sem a presença das nano-partículas de ouro.

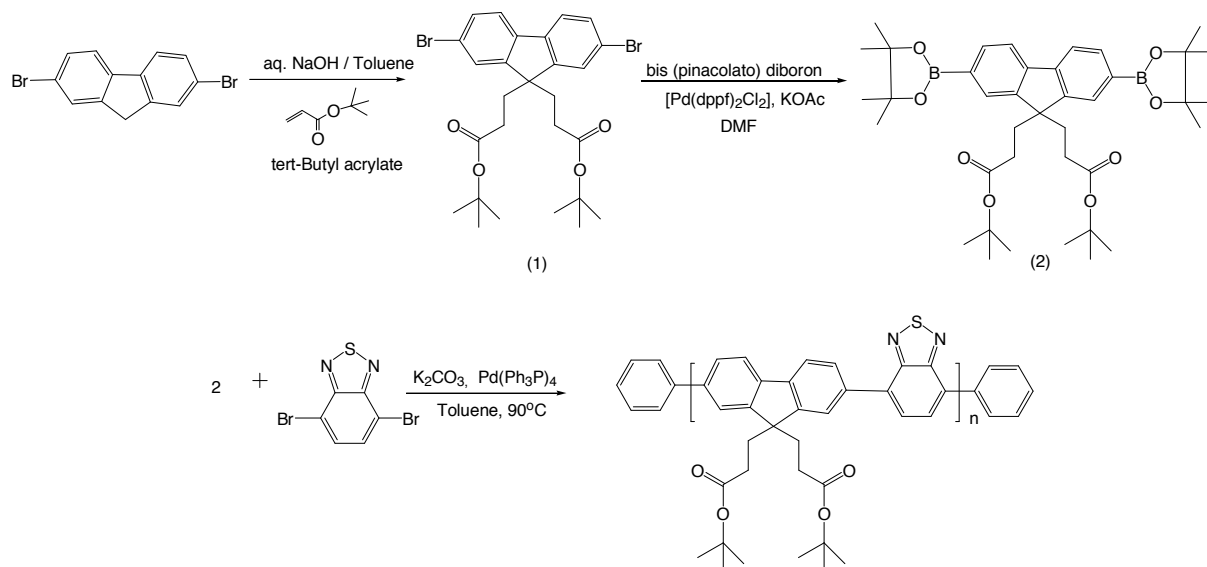
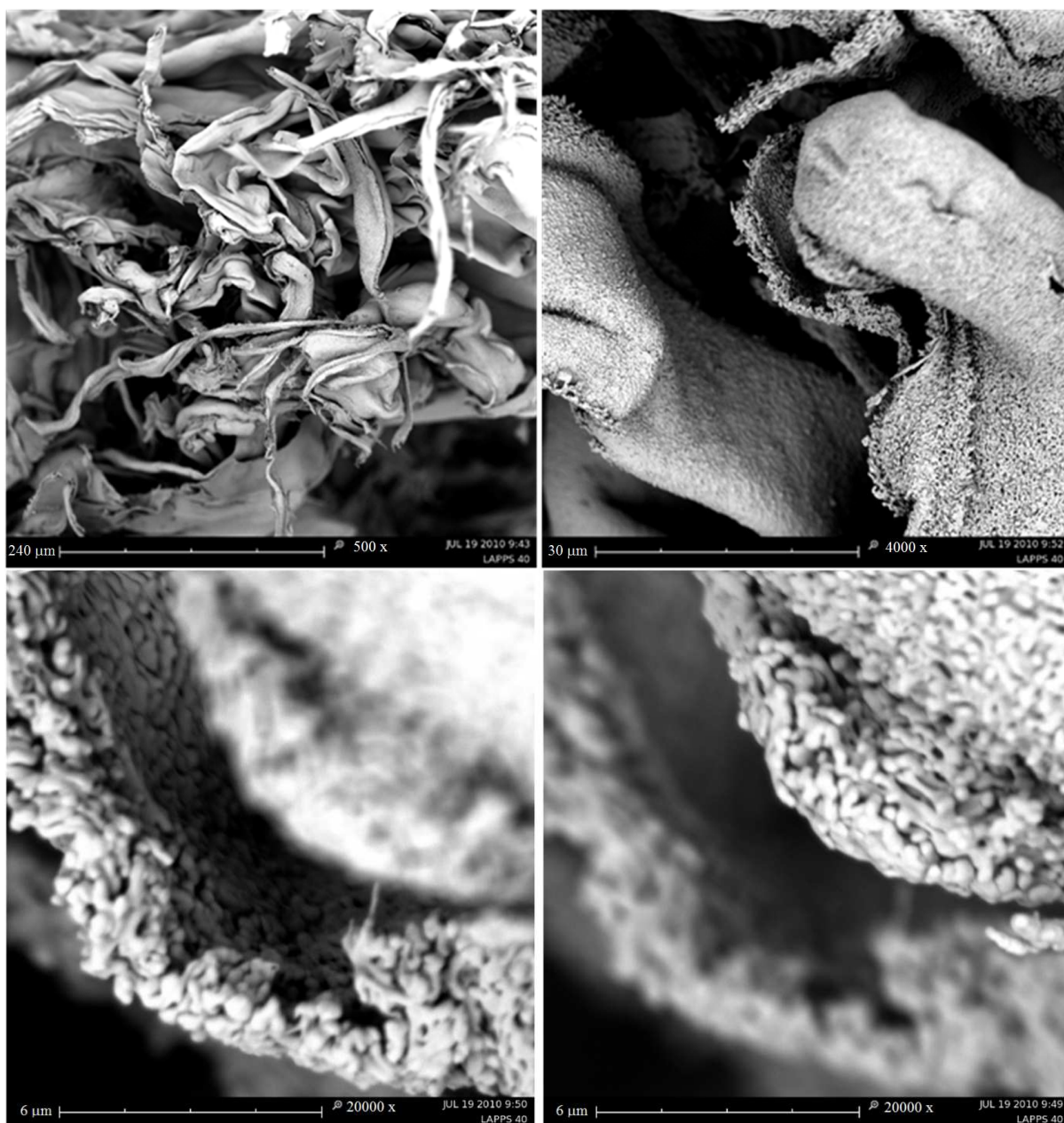


Figura 16 – Rota química para a síntese do poly[9, 9-bis(3'-(t-butyl propanoate))fluorene-co-4,7-(2,1,3-benzothiadiazole)] (LaPPS40).

### 4.1.1 Caracterização do Polímero

O polímero apresentou uma boa solubilidade em solventes orgânicos, tais como clorofórmio ( $\text{CHCl}_3$ ), tetrahydrofurano (THF), metilpirrolidona (NMP) e 1,2-diclorobenzeno (o-DCB). Algumas medidas indicam que a massa molar do polímero era provavelmente maior do que a obtida a partir de dados de GPC (cromatografia por permeação em gel) com base em padrões de poliestireno, fazendo com que o polímero tenha estrutura estável, fibrosa e homogênea, podendo ser depositado como filme quando em solução. A Figura 17 mostra as imagens típicas SEM do polímero no estado sólido, apresentando uma estrutura de fita micrométrica. As fitas são compostas de estruturas nanométricas com características porosas.



*Figura 17 – Imagens do LaPPS40 em estado sólido feitas por SEM.*

A Tabela 1 mostra alguns resultados das medidas de XPS. As percentagens atômicas e as energias de ligação de S, N, O e C com suas ligações mostraram-se em excelente concordância com os resultados publicados para polímeros igualmente ligados [56].

Tabela 1 – Resultados de análise por XPS do polímero LaPPS40 e dados teóricos.

| Elementos/<br>Ligações | XPS (%) | Teórico (%) | Energia de Ligação (eV)<br>(XPS) | Energia de Ligação (eV)<br>(Teórico) |
|------------------------|---------|-------------|----------------------------------|--------------------------------------|
| S <sub>2p</sub>        | 2.5     | 2.5         | 165.37/166.54                    | 162.85/163.24                        |
| C <sub>1s</sub>        | 81.2    | 82.5        | 285-289                          | 276.66-280.82                        |
| N <sub>1s</sub>        | 4.4     | 5           | 399.75                           | 391.38                               |
| O <sub>1s</sub>        | 11.9    | 10          | 533.0                            | 521.63                               |
| C-C/C-H                | 70.4    | 72.5        | 285.0                            | 276.66                               |
| C-O                    | 5.8     | 5.0         | 287.0                            | 277.79                               |
| C=O                    | 5.0     | 5.0         | 289.0                            | 280.82                               |

A Figura 18 mostra o espectro obtido por XPS da banda de valência do polímero LaPPS40. A banda de valência abaixo do nível de Fermi é dominada pelas bandas C<sub>2p</sub> e C<sub>2s</sub> e os picos principais do espectro foram reproduzidos por cálculos teóricos da densidade de estados apresentados na mesma Figura 18. Os resultados encontrados através da quantificação por XPS, de modo geral, estão de acordo com os obtidos teoricamente através de cálculo *ab initio*.

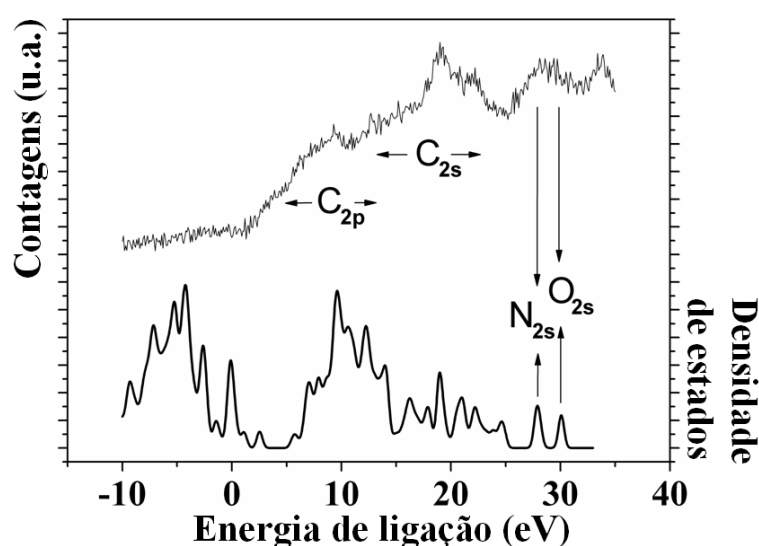
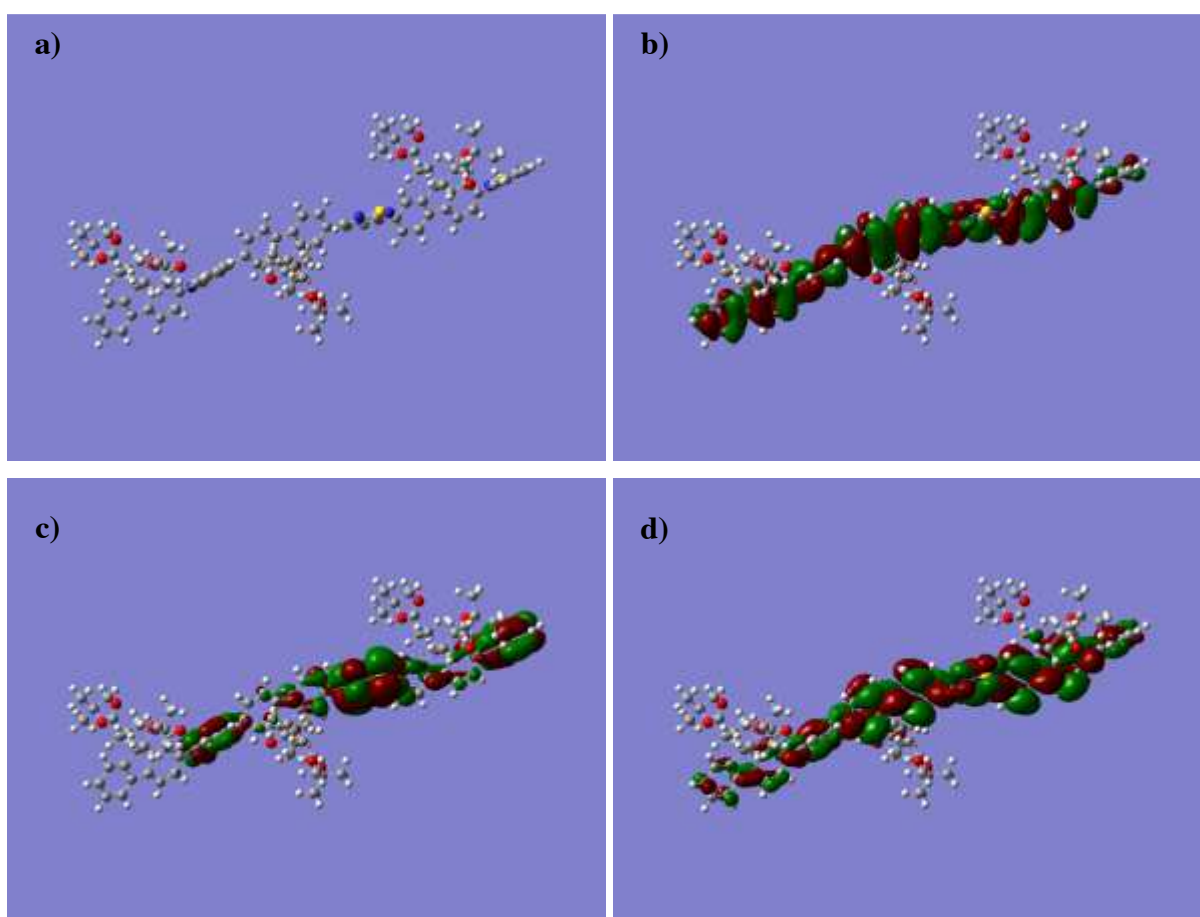
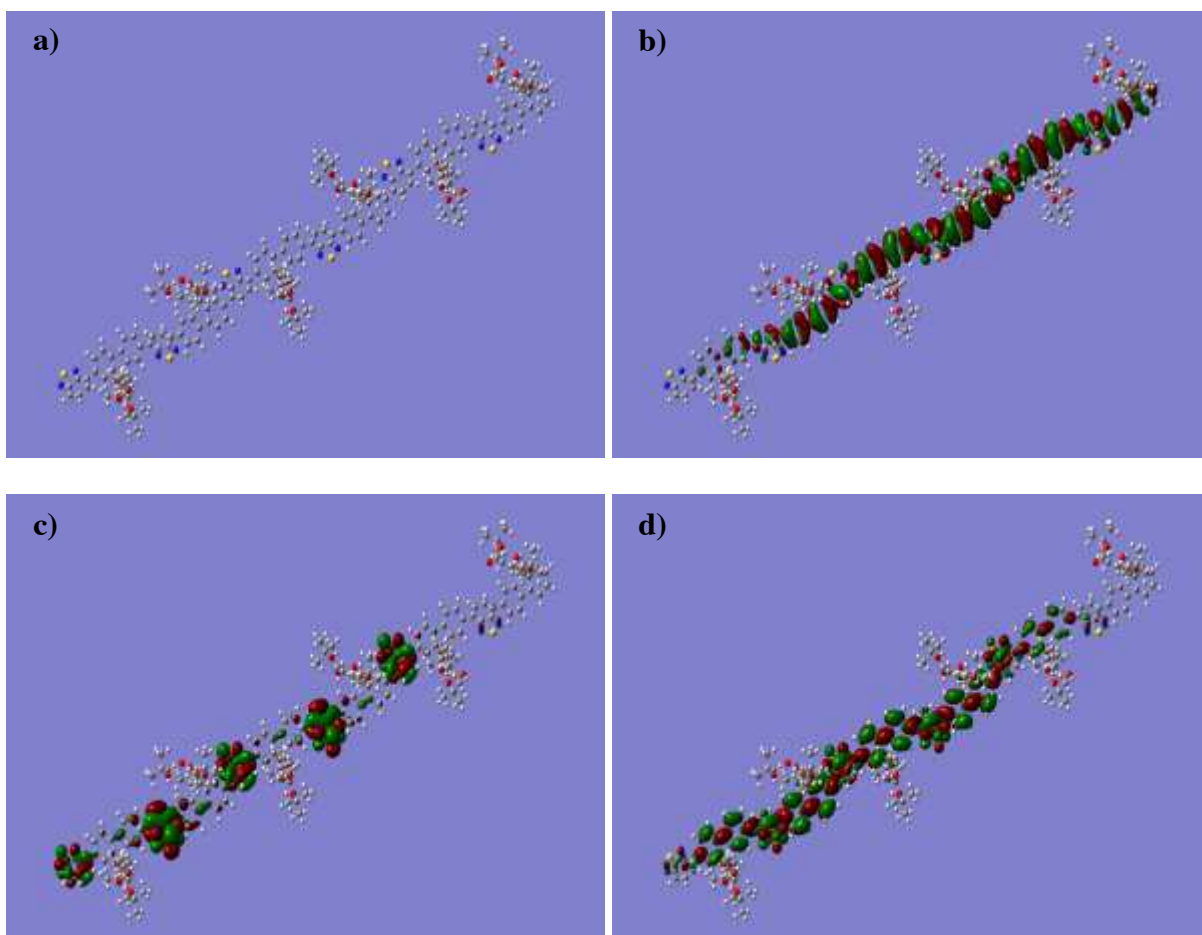


Figura 18 – Espectro da banda de valência do polímero LaPPS40 obtido por XPS (curva superior) comparado com a densidade de estados obtida por simulação teórica (curva inferior).

A geometria do oligômero contendo 3 e 6 unidades repetitivas é mostrada na Figura 19a e Figura 20a, respectivamente. Os resultados teóricos foram obtidos utilizando o conjunto de base 6-31g através de DFT/B3LYP, pois fornece bons resultados para polímeros conjugados [57] e moléculas muito grandes [58]. A geometria otimizada e as distribuições de cargas correspondentes aos orbitais HOMO e LUMO são apresentados da Figura 19b à 19d para o trímero e Figura 20b à 20d para o hexâmero. Os cálculos indicam que as unidades fluoreno em um n-mero formam uma configuração geométrica planar, mas suas orientações relativas aos grupos benzotiadiazol são, em sua maioria, ortogonais no estado fundamental. A escolha de serem feitos os cálculos, utilizando o trímero do LaPPS40, foi devido à semelhança entre a geometria otimizada e as densidades eletrônicas do trímero e hexâmero, economizando, assim, recursos computacionais.



*Figura 19: a) Geometria otimizada do trímero do LaPPS40; b) Representação da distribuição de carga do orbital HOMO; c) Representação da distribuição de carga do orbital LUMO; d) Representação da distribuição de carga do orbital LUMO+3. Os átomos estão representados com as cores: cinza – carbono, branco – hidrogênio, vermelho – oxigênio, azul – nitrogênio e amarelo – enxofre.*



*Figura 20: a) Geometria otimizada do hexâmero do LaPPS40; b) Representação da distribuição de carga do orbital HOMO; c) Representação da distribuição de carga do orbital LUMO; d) Representação da distribuição de carga do orbital LUMO+3. Os átomos estão representados com as cores: cinza – carbono, branco – hidrogênio, vermelho – oxigênio, azul – nitrogênio e amarelo – enxofre.*

Assim, as energias dos orbitais HOMO e LUMO para 3 unidades repetitivas são satisfatórias quando comparadas com os dados experimentais obtidos por voltametria cíclica. O espectro de absorção óptica também condiz com o experimento. Esse fato não significa que a conjugação efetiva do polímero seja de 3 unidades, mas que os cálculos podem ser feitos utilizando o trímero do LaPPS40. Foram calculadas as energias dos orbitais HOMO e LUMO dos oligômeros de 1 a 6 unidades repetitivas e analisadas, como mostra a Figura 21.



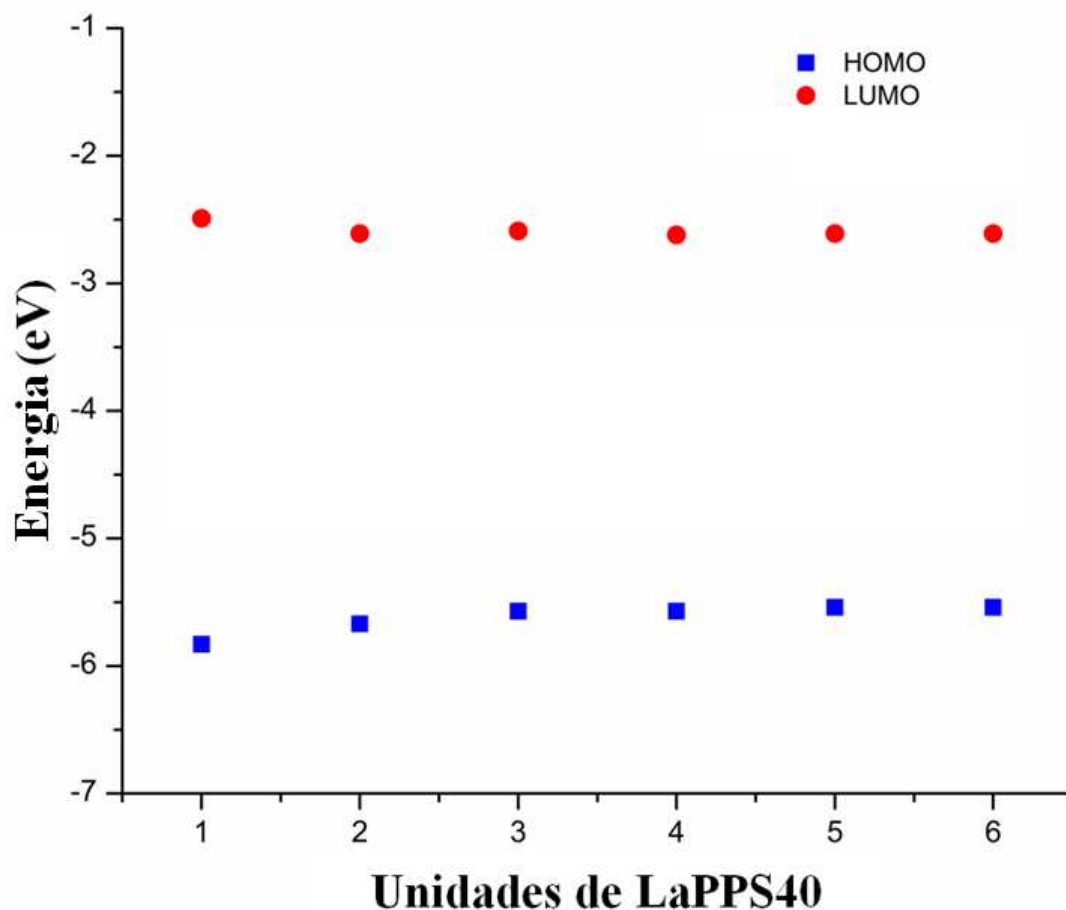


Figura 21: Níveis de energia calculados do HOMO e LUMO por unidade de LaPPS40.

A partir do trímero, as energias do HOMO e LUMO tendem a permanecer as mesmas, o que significa que para efeito de cálculo basta utilizar o trímero ao invés de utilizar a geometria de um n-mero com n maior que 3, reduzindo o tempo de processamento e não necessite recursos computacionais muito superiores aos utilizados para o cálculo do mesmo.

Assumindo que a transição é puramente eletrônica no vácuo e que não há acoplamento vibracional envolvido, a banda de maior energia é atribuída à transição  $\pi$ - $\pi^*$  ( $S_0 \rightarrow S_4$ , com a maior contribuição do  $\text{HOMO} \rightarrow \text{LUMO} + 3$ ), com uma força de oscilador de 1,0604, mostrado na Tabela 2. A distribuição de carga para esse estado excitado pode ser visto na Figura 19d. A banda de menor energia pode ser atribuída à transição entre  $S_0$  e  $S_1$ , cuja maior contribuição é do  $\text{HOMO} \rightarrow \text{LUMO}$ .

Tabela 2: Transições de maior contribuição para uma banda centrada no comprimento de onda (primeira coluna) do espectro de absorção eletrônica para o trímero, calculado teoricamente.

| Comprimento de Onda Teórico (nm) | Força do Oscilador | Transição                       | Contribuição (%) |
|----------------------------------|--------------------|---------------------------------|------------------|
| 326                              | 1,0604             | HOMO $\rightarrow$ LUMO + 3     | 17               |
|                                  |                    | HOMO - 2 $\rightarrow$ LUMO + 5 | 6                |
|                                  |                    | HOMO - 1 $\rightarrow$ LUMO + 4 | 7                |
|                                  |                    | HOMO $\rightarrow$ LUMO + 4     | 9                |
| 461                              | 1,1319             | HOMO - 1 $\rightarrow$ LUMO + 2 | 13               |
|                                  |                    | HOMO $\rightarrow$ LUMO         | 38               |
|                                  |                    | HOMO - 3 $\rightarrow$ LUMO + 2 | 6                |
|                                  |                    | HOMO $\rightarrow$ LUMO + 2     | 7                |

O espectro de absorção, visto na Figura 22, mostra duas absorções principais, uma em  $\lambda_{\text{max}} = 317$  nm e outra em  $\lambda_{\text{max}} = 445$  nm. Estas absorções são responsáveis por duas emissões do LaPPS40 no comprimento de onda de  $\lambda_{\text{em}} = 532$  nm, a qual foi estudada através da análise da força dos osciladores harmônicos obtidos teoricamente. Os potenciais de oxidação e redução do LaPPS40 foram determinados por voltametria cíclica, o qual forneceu valores para as energias de HOMO e LUMO de -5,60 eV e -3,07 eV, respectivamente. Os valores obtidos teoricamente para a energia do HOMO foi de -5,54 eV e para o LUMO foi de -2,61 eV. Tendo em vista as aproximações utilizadas na informação teórica, estas duas bandas podem ser atribuídas a transições de HOMO  $\rightarrow$  LUMO+3 e HOMO  $\rightarrow$  LUMO, onde uma transferência de carga interna (ICT) ocorre a partir do fluoreno para as unidades de benzotiadiazol em 445 nm. Estes dois fenômenos são os responsáveis pelas duas fluorescências do LaPPS40 em  $\lambda_{\text{em}} = 532$  nm.

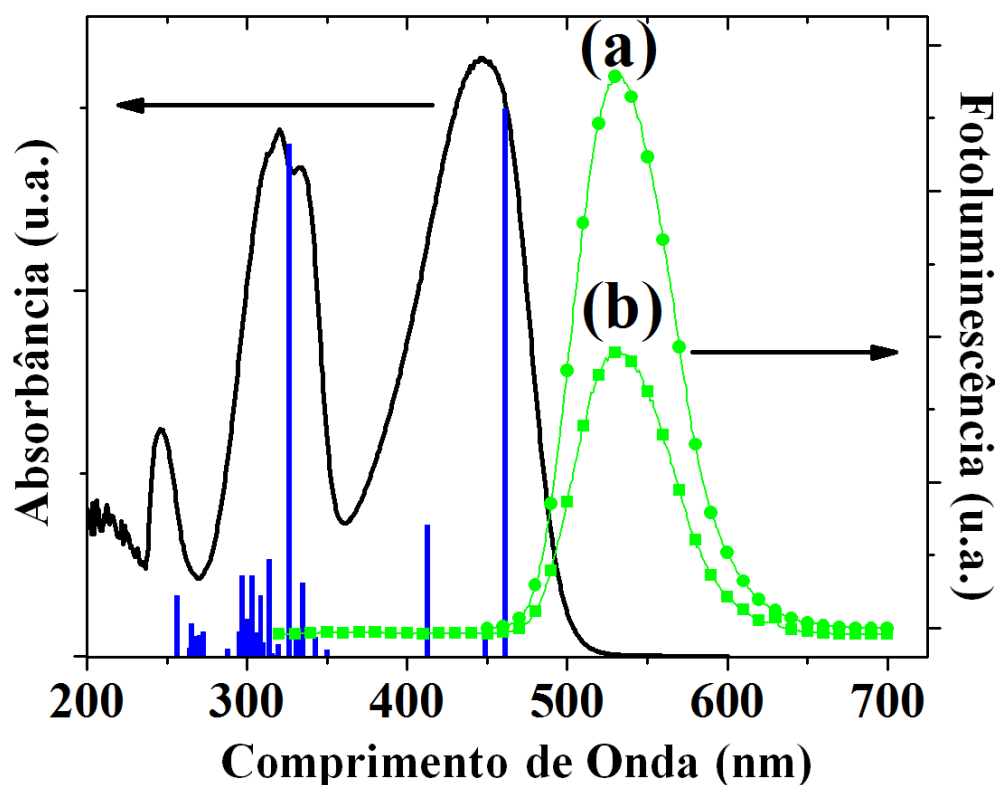


Figura 22: As curvas mostram o espectro de absorção eletrônica e fotoluminescência do LaPPS40 (em solução de  $10^{-5} \text{ molL}^{-1}$  de clorofórmio) medida experimentalmente; a) em  $\lambda_{exc} = 445 \text{ nm}$  e b)  $\lambda_{exc} = 317 \text{ nm}$ . As colunas azuis indicam a força dos osciladores calculados teoricamente.

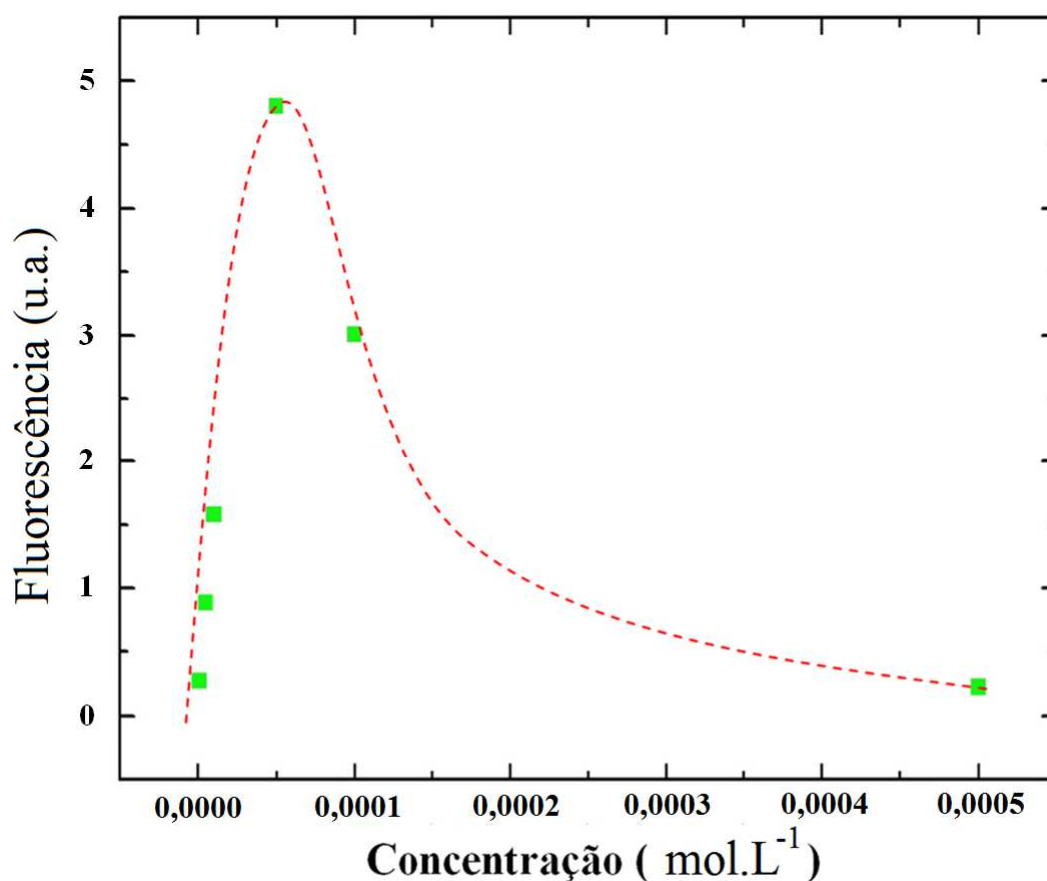
Esta fluorescência no comprimento de onda  $\lambda_{em} = 532 \text{ nm}$  é característica da cor verde. Coincidentemente é o comprimento de onda de absorção óptica do plásmon do ouro, o qual também foi medido experimentalmente. Quando excitado tanto em 317 nm ou 445 nm a emissão do LaPPS40 localiza-se centrada em 532 nm, porém com intensidades diferentes devido à conversão interna. Na Figura 22, a fluorescência (a) e (b) são devido às absorções em 445 nm e 317 nm, respectivamente. Esta cor verde está apresentada na Figura 23.



*Figura 23: Emissão do LaPPS40 quando excitado com uma lâmpada UV comercial.*

Também foi testada a fluorescência do LaPPS40 em função de sua concentração em solvente.

Esta medida de intensidade de fluorescência pode ser vista na Figura 24.



*Figura 24: Fluorescência pela Concentração de LaPPS40 em volume de THF adicionado. A linha vermelha pontilhada serve apenas como guia.*

Analisando a Figura 24 pode-se observar que a fluorescência do LaPPS40 inicialmente aumenta com o acréscimo de solvente, porém a partir de uma concentração limite esta fluorescência volta a decrescer. Inicialmente foi utilizada uma concentração de LaPPS40 de aproximadamente  $10^{-3}$  mol.L<sup>-1</sup>. Desta forma foi estabelecida uma região na qual seriam feitos os testes com as nano-partículas de ouro e a fluorescência foi novamente analisada, só que agora em uma faixa de concentração em que aumentava-se a diluição de 20  $\mu$ L até 200  $\mu$ L, apresentada pela Figura 25.

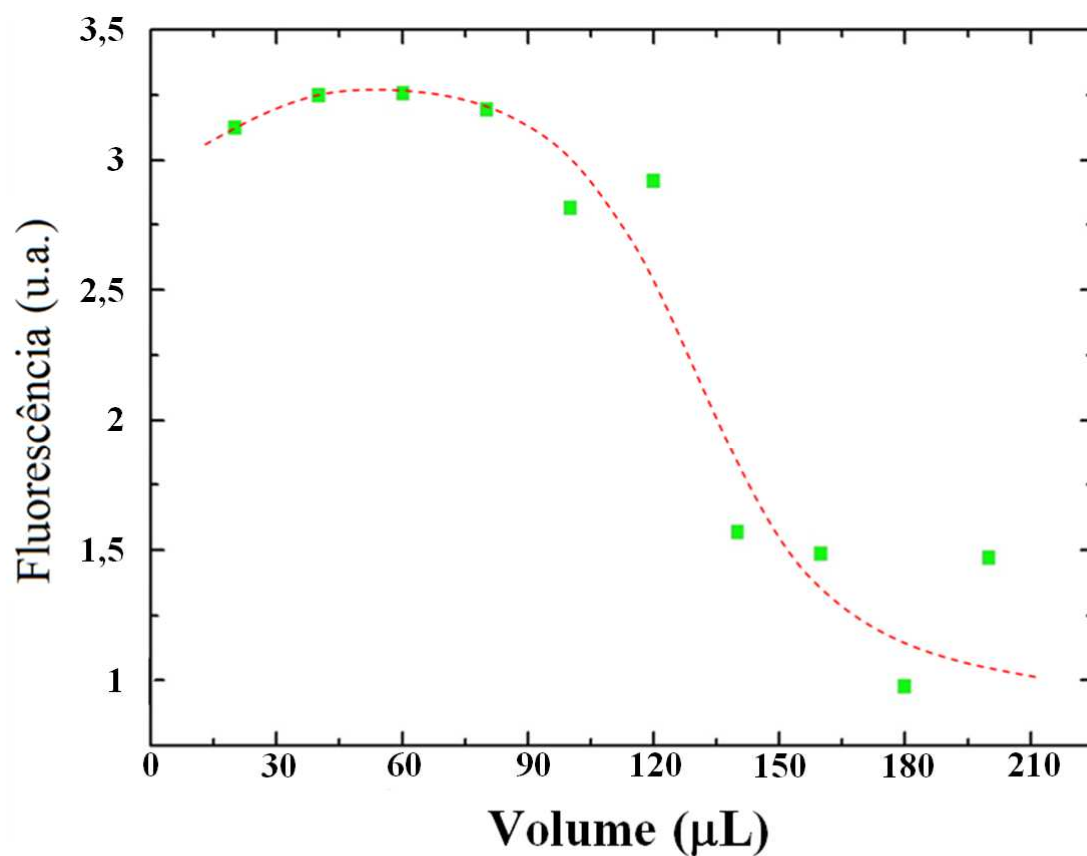


Figura 25: Fluorescência do LaPPS40 em uma concentração de  $10^{-4} \text{ mol.L}^{-1}$  pelo volume de THF adicionado. A linha vermelha pontilhada serve apenas como guia.

Medidas foram realizadas com intervalo de concentração menores para uma melhor resolução. À medida que foi adicionado mais THF a fluorescência do LaPPS40 foi reduzida. Este ensaio foi realizado com o intuito de saber a influência do solvente na fluorescência quando fossem colocadas as nano-partículas de ouro.

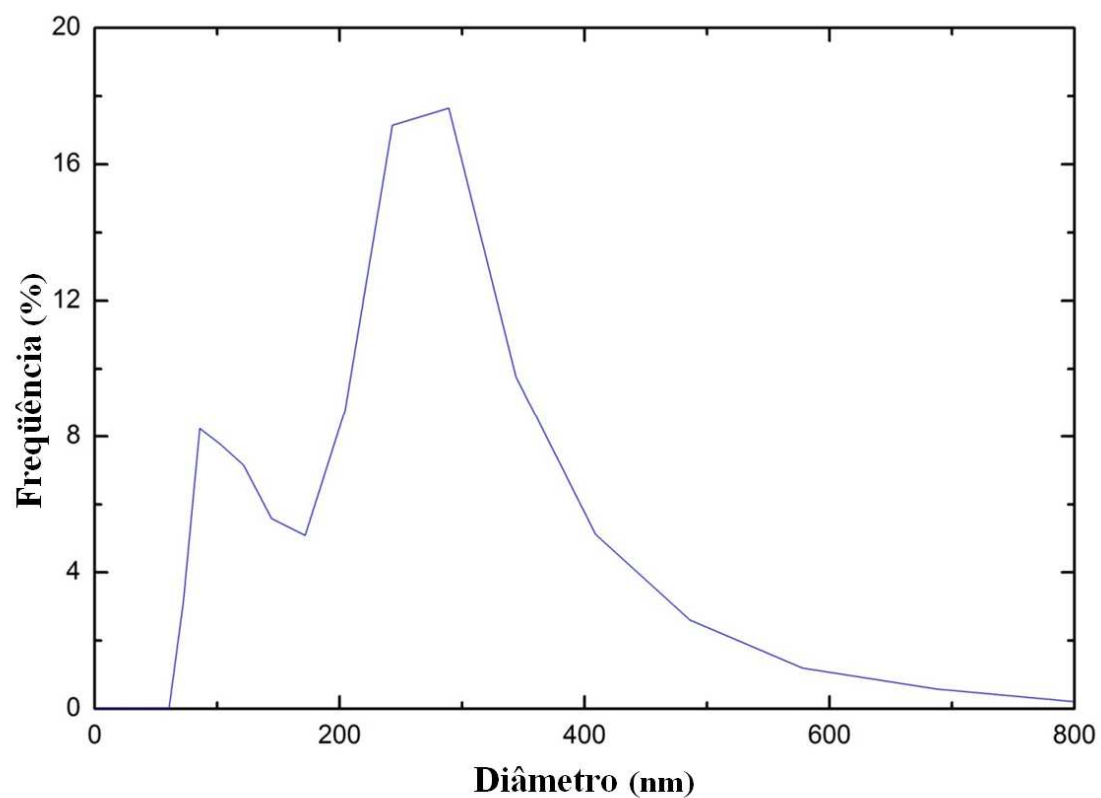
### **4.1.2 Fluorescência do LaPPS40 com adição de nano-partículas de ouro**

Nesta seção serão apresentados os resultados da supressão da fluorescência devido às nano-partículas de ouro.

O uso de nano-partículas em diagnósticos tem sido amplamente investigado devido às propriedades ópticas [59] ou como marcadores [60] [61] [62] [63]. O plásmon das nano-partículas de ouro possuem absorção óptica centrada em 532 nm, coincidentemente com a emissão do LaPPS40, assim, esperava-se que houvesse uma supressão da fluorescência desse polímero pela presença das nano-partículas. Quando um imunoenensaio é realizado, a detecção da doença deve-se a análise visual (por equipamento ou não). Em posse destas informações, foram realizados experimentos para averiguar se o LaPPS40 teria as características necessárias para a utilização nos imunoenaios diagnósticos.

Um ensaio com as mesmas proporções de THF foi realizado, só que com presença das nano-partículas. Como as nano-partículas não podem ser inseridas a seco, foram adicionadas de 20 em 20  $\mu\text{l}$  na solução de LaPPS40 de concentração  $10^{-3} \text{ mol.L}^{-1}$ .

A Figura 26 mostra que o diâmetro médio das nano-partículas de ouro utilizadas na medida da Figura 27 é em torno de 214,7 nm.



*Figura 26: Medidas de DLS para solução de LaPPS40 com nano-partículas de Au em THF (diâmetro médio de 214,7 nm). Observa-se duas distribuições de tamanhos distintas, uma em 100 nm e outra em 300 nm, aproximadamente.*



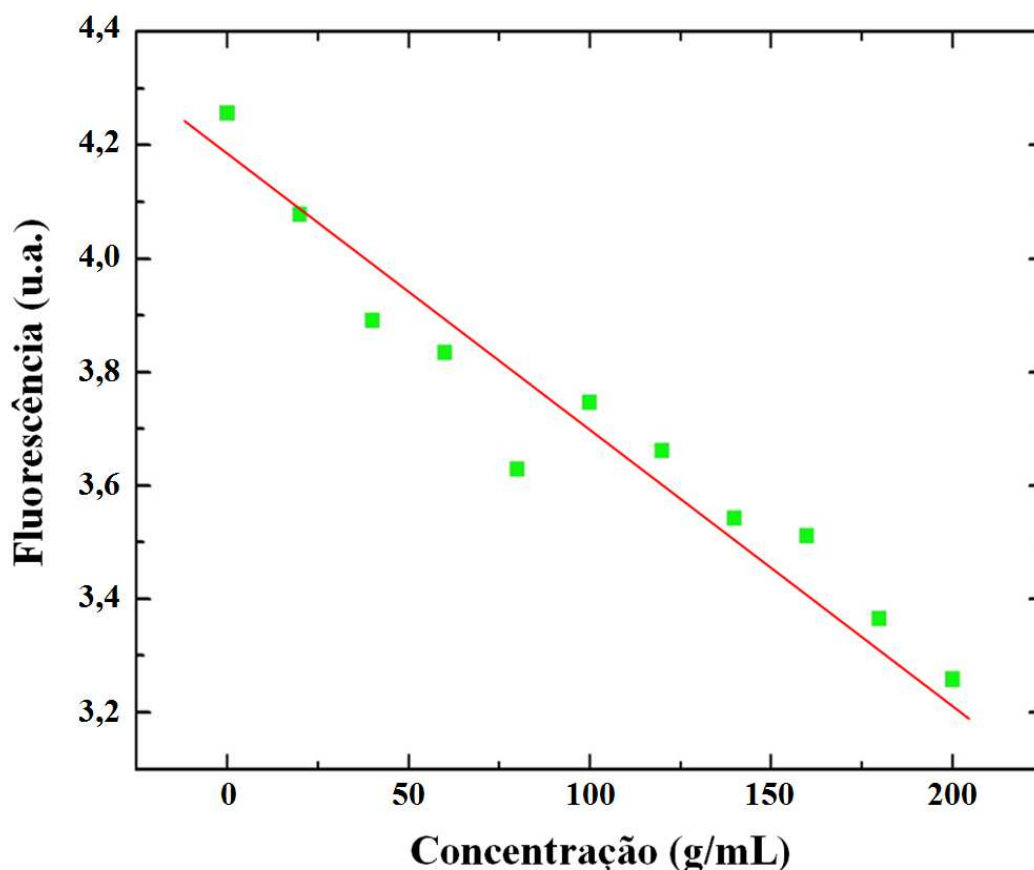
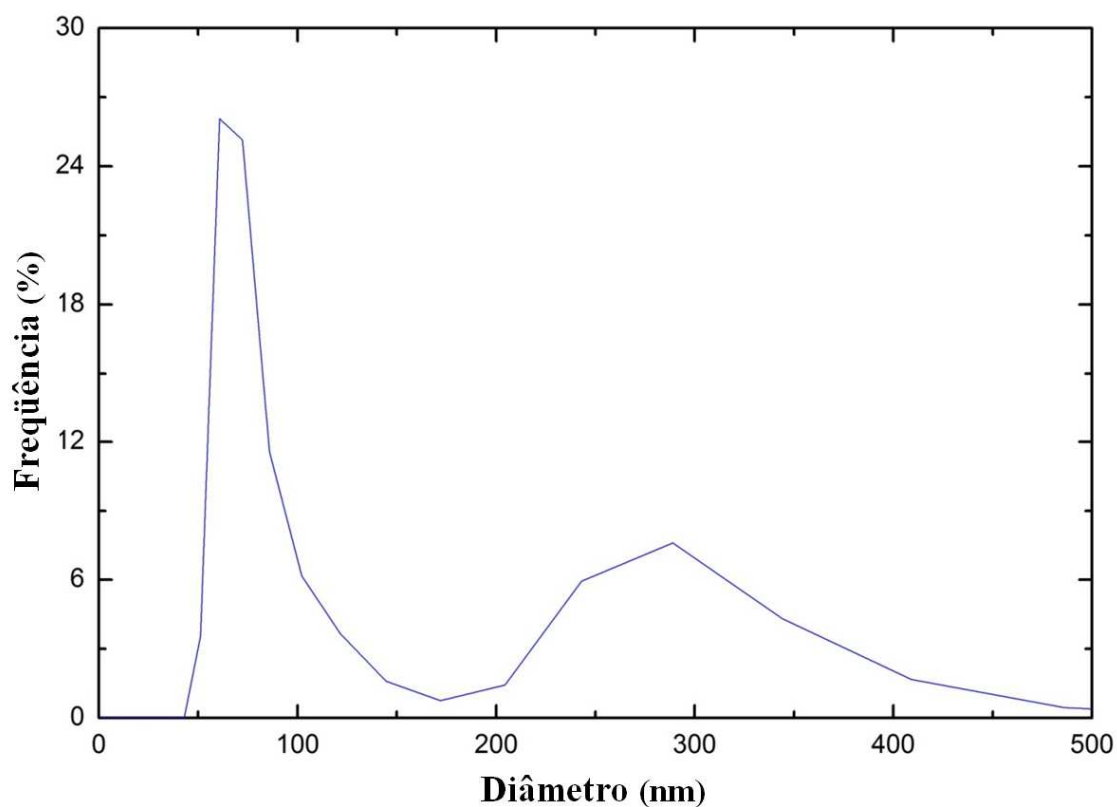


Figura 27: Gráfico da fluorescência do LaPPS40 pela concentração de nano-partículas de Au de diâmetro médio igual a 214,7 nm em dispersão de THF.

Também foi feita a medida variando o tamanho das nano-partículas de ouro. Com nano-partículas de diâmetro médio de 113,9 nm também houve um decréscimo na fluorescência do LaPPS40. Este fenômeno de decréscimo na fluorescência pode ser explicado como efeito de *quenching*, descrito na fundamentação teórica do presente trabalho. Como o ouro possui absorção de plásmons no comprimento de onda de  $\lambda_{\text{abs}} = 532$  nm e a emissão do LaPPS40 é de  $\lambda_{\text{em}} = 532$  nm, exatamente o mesmo valor, há uma transferência de energia não-radioativa, ocasionando a redução da emissão do LaPPS40. A Figura 28 mostra nano-partículas de diâmetro médio de 113,9 nm.



*Figura 28: Medidas de DLS para solução de LaPPS40 com nano-partículas de Au em THF (diâmetro médio de 113,9 nm). Observa-se duas distribuições de tamanhos distintas, uma em 75 nm e outra em 300 nm, aproximadamente.*

Com estas nano-partículas foi feita uma nova medida, mostrada na Figura 29. O comportamento da supressão da fluorescência se tornou mais linear, apesar da taxa de supressão não ter sido reduzida em comparação com o experimento da Figura 26.

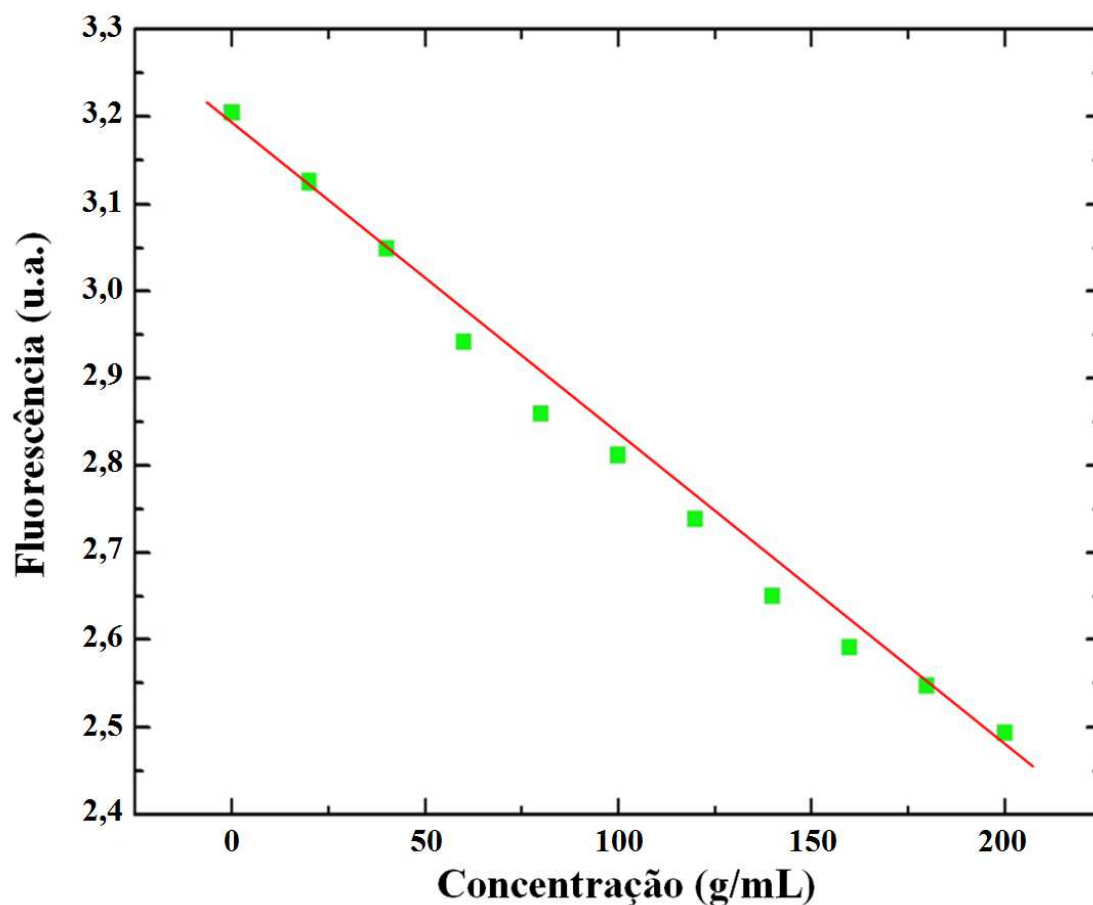


Figura 29: Gráfico da fluorescência do LaPPS40 pela concentração de nano-partículas de Au de diâmetro médio igual a 113,9 nm em dispersão de THF.

Como a FRET depende da distância entre o doador e receptor, foi feito mais um experimento, com nano-partículas ainda menores. Como as nano-partículas de ouro, neste caso, são muito pequenas em relação às outras analisadas, estas podem participar diretamente na transferência de energia por ressonância. A Figura 30 mostra a medida de DLS das nano-partículas de ouro que foram utilizadas na Figura 31.

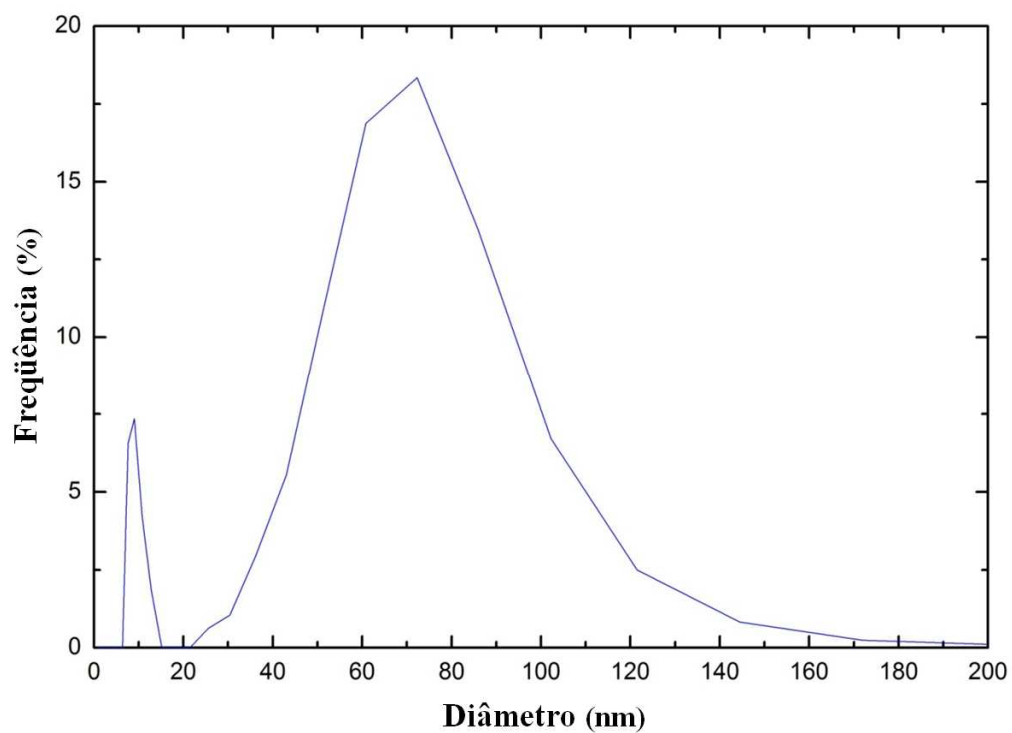


Figura 30: Medidas de DLS para solução de LaPPS40 com nano-partículas de Au em THF (diâmetro médio de 58,16 nm). Observa-se duas distribuições de tamanhos distintas, uma em 10 nm e outra, dominante, centrada em 70 nm, aproximadamente.

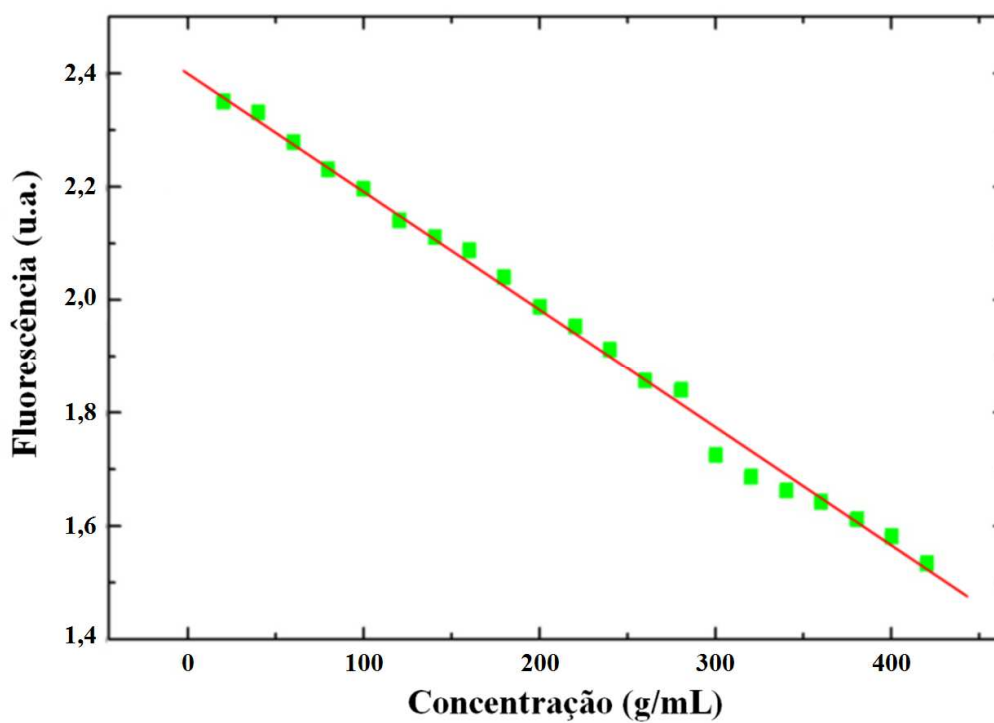


Figura 31: Fluorescência do LaPPS40 pela concentração de nano-partículas de Au de diâmetro médio igual a 58,16 nm em dispersão de THF.

## 4.2 *Syngonanthus nitens* (Bong.) Ruhland

### 4.2.1 Introdução

*Syngonanthus nitens* (Bong.) Ruhland é uma planta nativa da região central do Brasil e é chamada de capim dourado devido à sua haste, que brilha como fios de ouro. Apesar de ser erroneamente chamado de capim, *Syngonanthus nitens* é uma das mais de seis mil espécies da família *Eriocaulaceae* [64]. As hastes são coletadas, secas e usadas como um importante elemento de artesanato na produção de artigos decorativos dourados e utensílios, os quais representam uma das principais fontes de renda para as comunidades rurais em determinadas regiões brasileiras. Além disso, os objetos de decoração são vendidos e exportados mundialmente como artesanato exótico.

Artigos científicos sobre *S. nitens* são raros na literatura e, principalmente, dedicados a aspectos de sustentabilidade econômica e ecológica, o que torna surpreendente o fato da sua origem da cor dourada não ter sido ainda investigada.

Encontramos apenas dois trabalhos sobre o *Syngonanthus nitens*, os quais ajudam na compreensão da cor dourada. Ao tentar reforçar borracha natural com fibras de *S. nitens*, Siqueira *et al.* [65] determinou a composição do material biológico que constitui as hastes douradas. Eles encontraram que os caules são formados por 90% (w/w) de holocelulose (67% de celulose e 27% hemiceluloses), 6,5% (w/w) de lignina, 1,2% (w / w) de cinzas e 0,75% (w/w) de resíduos. Verificou-se que o índice de cristalinidade das escalas de celulose era cerca de 70,1%. Assim, as hastes têm alto teor de celulose, quase tão alta como plumas de algodão [66]. Em um trabalho publicado por Pacífico *et al.* [29] sobre o capim dourado foi apresentada a análise da composição química do extrato de sua haste e de sua flor. Para determinar os 17 tipos específicos de flavonóides, dos quais apenas 8 foram encontrados na haste, foram realizadas medidas de Ressonância Magnética Nuclear (RMN), Cromatografia Líquida de Alta Eficiência Acoplada a Espectrometria de Massas (HPLC-ESI-MS), Cromatografia Contracorrente de Alta Velocidade (HSCCC) e outras técnicas cromatográficas [29].

## 4.2.2 Caracterização

Nesta seção serão apresentados os resultados obtidos experimentalmente que ajudam a explicar a razão física pelo qual o *S. nitens* possui cor e brilho dourados.

Foram utilizadas amostras de um objeto de decoração comercial feito de capim dourado, apresentado na Figura 32, onde é feita uma comparação qualitativa entre o brilho e cor dourados do capim dourado e uma moeda de ouro.

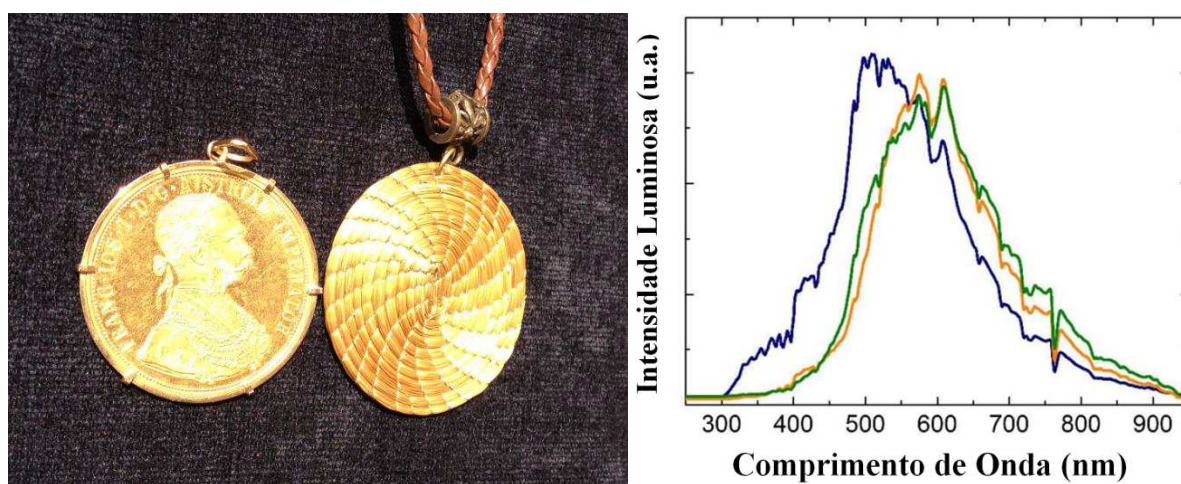
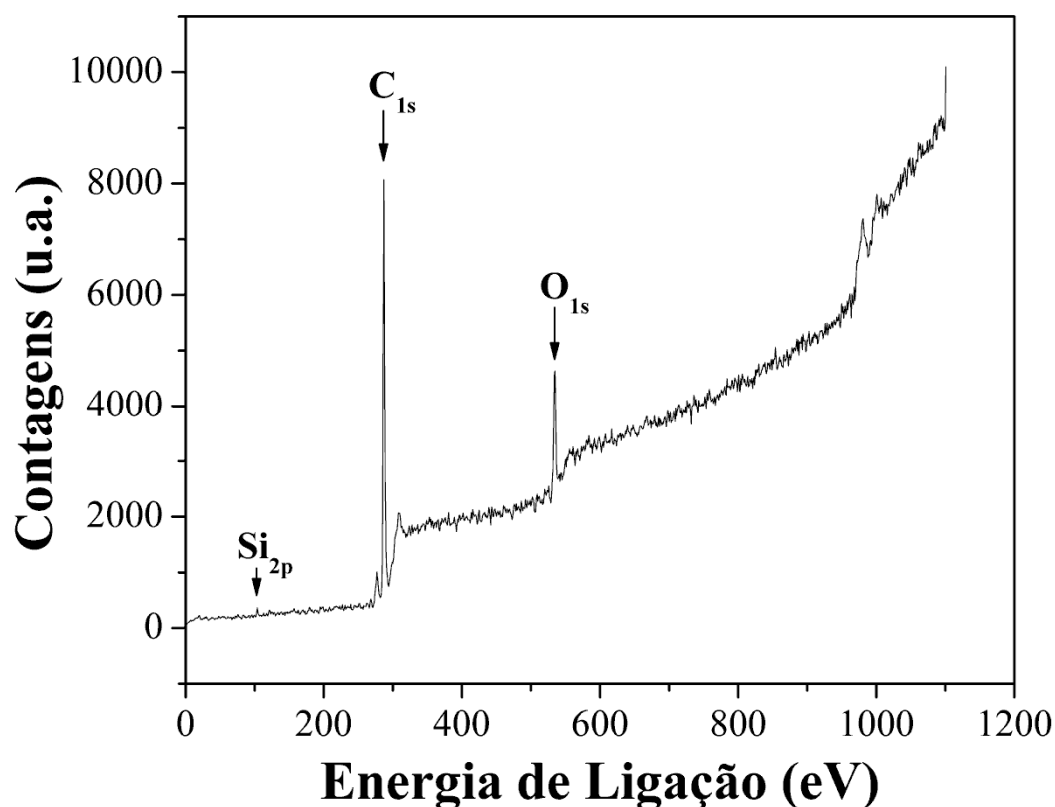


Figura 32: Uma comparação da aparência visual de uma moeda de ouro e artesanato de *S. nitens*. A semelhança de ambos os objetos também é mostrado por meio de medições de refletância de luz solar (direita). O espectro solar (linha azul) foi obtido por uma fibra óptica ligada ao espectrômetro. Reflexão de luz foi coletada a 45° para o ouro (linha amarela) e *S. nitens* (linha verde).

Os caules foram cortados em pedaços adequados para as diferentes caracterizações. O extrato da haste foi obtido a partir da suspensão destes em álcool metílico ou água destilada à temperatura ambiente e colocados em uma ultrassonicadora durante uma hora.

O primeiro aspecto estudado para a caracterização da haste foi a composição dos elementos na superfície através da quantificação dos mesmos por XPS. O espectro de XPS mostrou que a superfície é composta por C 86,6 at% e O 11,7 at%. Foi encontrado Si 1,7 at%, que corresponde à impureza, apresentado na Figura 33.



*Figura 33: Espectro da banda de valência da haste de *S. nitens* obtido por XPS.*

A alta concentração de carbono na superfície é devido à epiderme das hastes [67], que é composta principalmente por cutina, ceras e alcanos  $C_{24}$  e  $C_{34}$  [68]. A Figura 34 mostra o espectro de alta resolução do XPS do  $C_{1s}$  da haste e do extrato de capim dourado, onde pode-se ver que no extrato há outras ligações do carbono devido à presença de oxigênio, referentes às ligações C-C/C-H, C-O e C=O, onde ver-se-á no Capítulo 4.3.3 que estas ligações correspondem às ligações do oxigênio dos flavonóides.

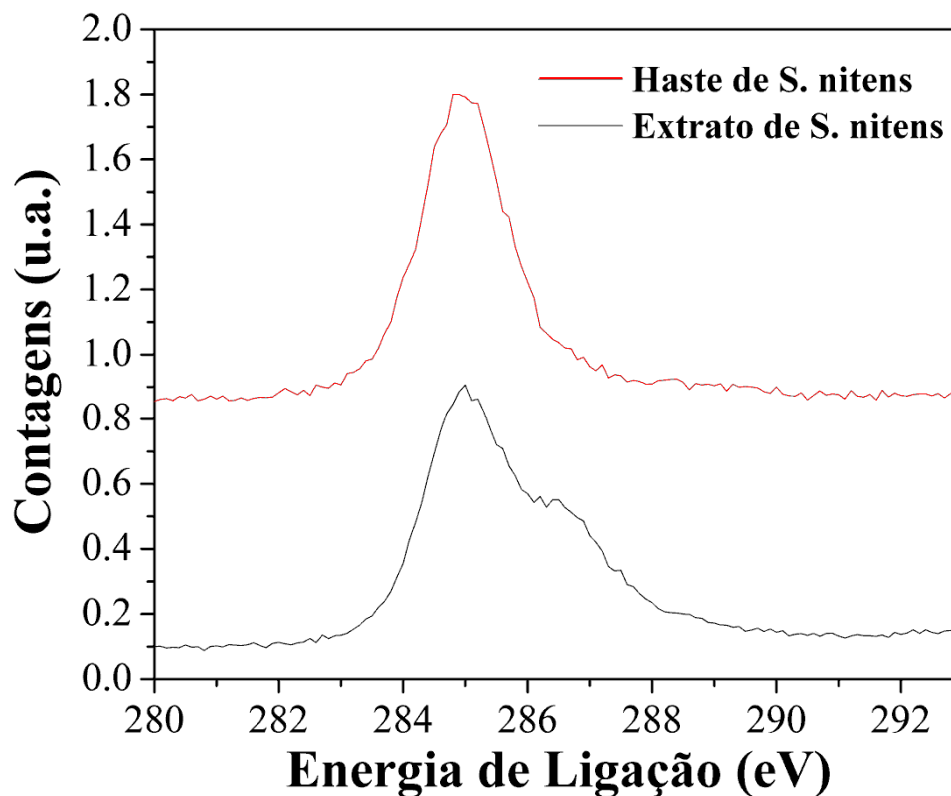


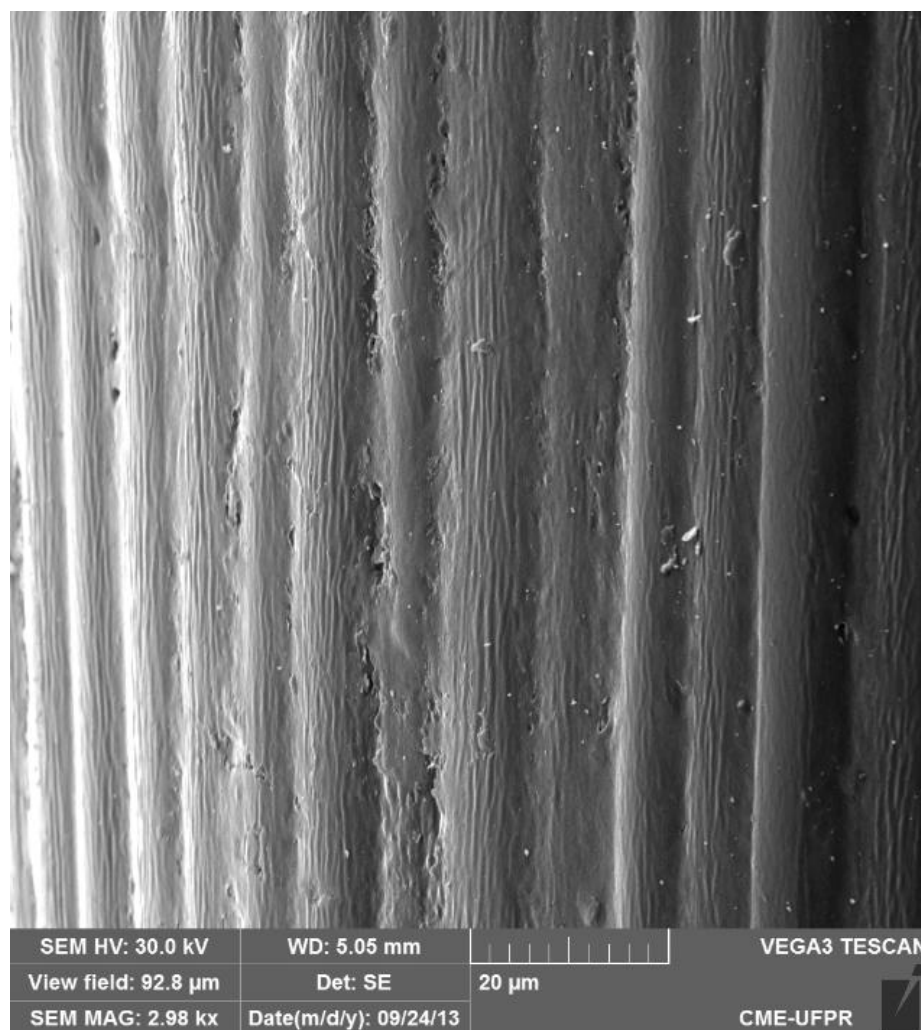
Figura 34: Comparação dos espectros de alta resolução do XPS do C<sub>1s</sub> da haste (em vermelho) e do extrato (em preto) de *S. nitens*.

Não foram encontrados outros elementos, mostrando que a cor dourada não é devido a metais.

A refletividade de metais é causada pela interação de elétrons livres com o campo eletromagnético incidente. Nas frequências correspondentes à luz visível, a profundidade de penetração da luz incidente é mínima, e a luz é quase totalmente refletida, o qual dá o aspecto brilhante nos metais [69]. Além disso, para o ouro, ocorrem excitações de elétrons da banda 5d, que é muito próximo ao nível de Fermi. Estas excitações são causadas pela absorção de fótons na faixa do violeta/azul do espectro visível e a reflexão da luz branca mostra a coloração vermelha típica deste metal precioso [70]. Por outro lado, várias espécies na fauna são capazes de produzir cores douradas brilhantes, devido às estruturas e aos padrões de interferência gerados pela sua superfície, como as encontradas nas asas de borboletas [71] ou em algumas espécies de besouros [72], causando o aspecto dourado. Com isso, procurou-se verificar a existência de tais estruturas.



As imagens de microscopia eletrônica de varredura da haste do *S. nitens* mostram que sua superfície é lisa, com uma ondulação típica de 10  $\mu\text{m}$ , exposto na Figura 35. Dentro dessas ondulações são vistas várias nanoestruturas em grelhas. A suavidade global da superfície é responsável pelo aspecto brilhante da superfície da haste, que é comum em materiais polidos [69].



*Figura 35: Imagem de microscópio eletrônico de varredura (MEV) da superfície da haste do *S. nitens*. A superfície é caracterizada por micro/nano estruturas, que se estendem ao longo do eixo da haste. A ampliação SEM para esta imagem foi 2,98 kX.*

Também foi feita uma imagem 3D de uma área de  $47 \times 35 \mu\text{m}^2$  da superfície da haste. Através de uma linha virtual sobre esta imagem 3D foram feitos gráficos de ondulação e

rugosidade, mostrados na Figura 36. A ondulação típica é de  $10 \pm 1 \mu\text{m}$  e a rugosidade média é de  $98 \pm 3 \text{ nm}$ , enquanto o valor quadrático médio (RMS) da rugosidade é de  $128 \pm 3 \text{ nm}$ . Esses dados são obtidos de três imagens no mesmo local e, por conseguinte, são apenas um indicativo da topografia geral da superfície da haste. No entanto, eles são suficientes para descartar efeitos de interferência da luz visível, uma vez que esses efeitos são ou muito acima ou muito abaixo do comprimento de onda da luz visível.

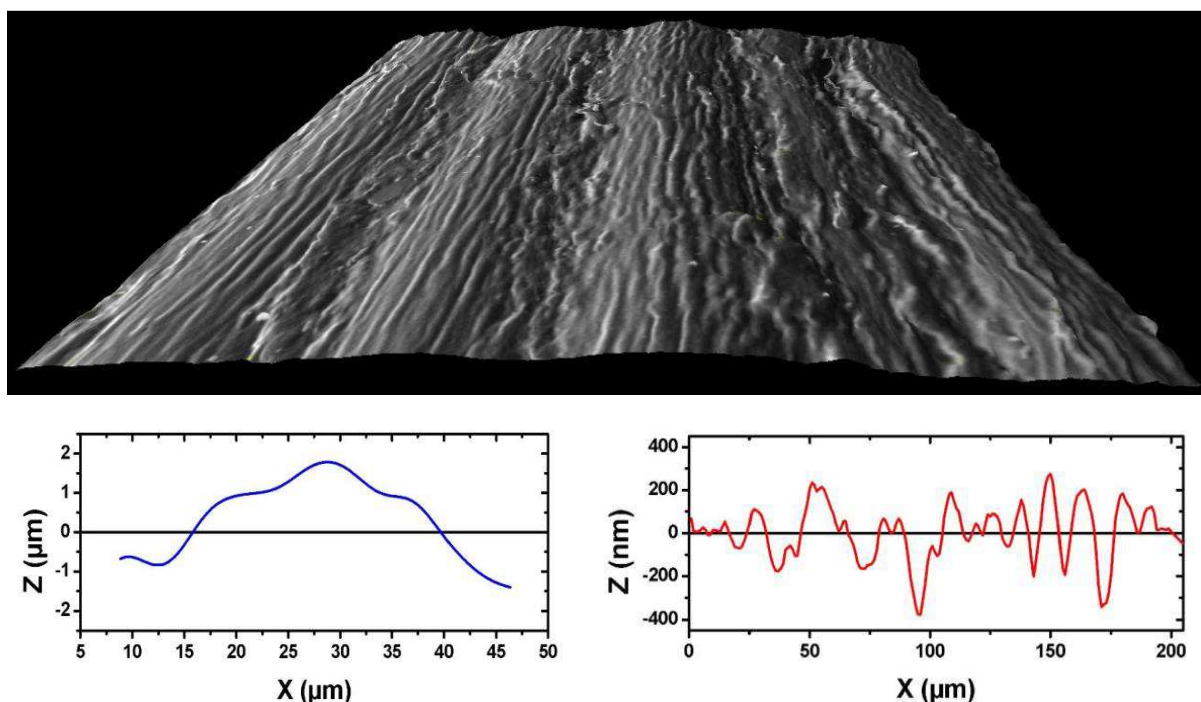
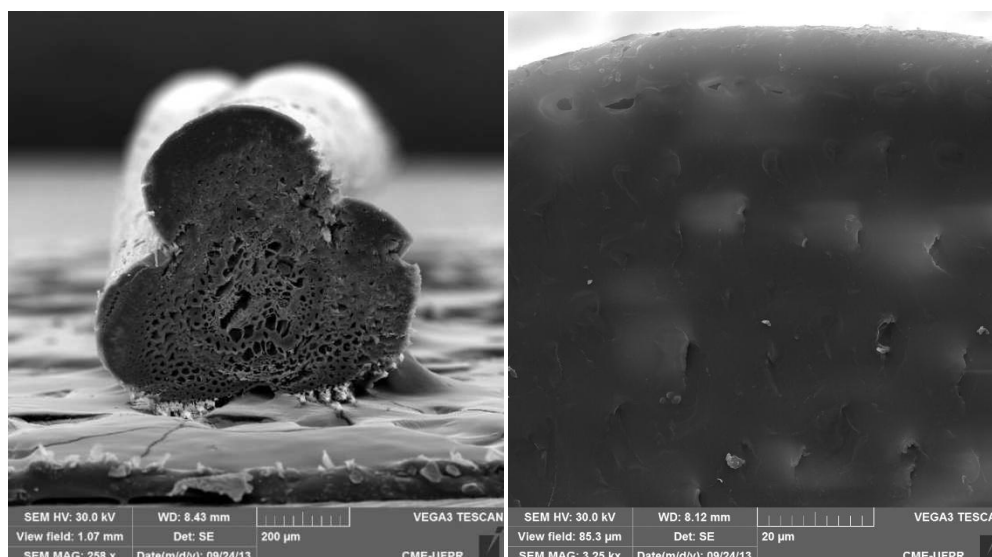


Figura 36: Imagem 3D (acima e central), ondulação típica (abaixo à esquerda) e rugosidade (abaixo à direita) da superfície *S. nitens*.

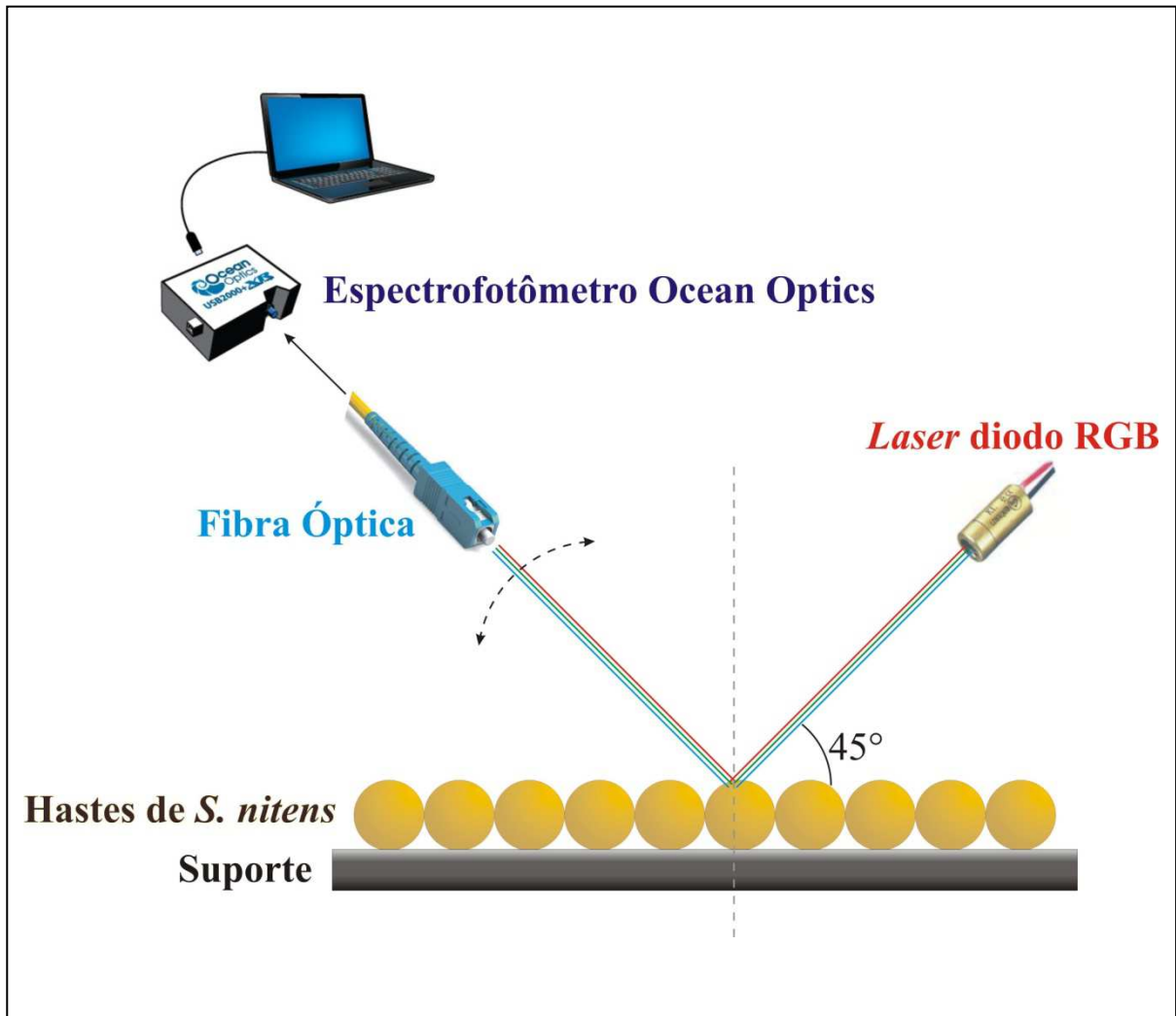
A caracterização da superfície por microscopia eletrônica de varredura através da emissão de elétrons secundários não é suficiente para descrever a estrutura. Então foi feita uma análise da secção transversal da haste, que resultou nas imagens da Figura 37.



*Figura 37: Imagens transversais MEV da haste do S. nitens. A ampliação foi de 258 X (esquerda) e 3,25 kX (direita), respectivamente.*

As hastes secas têm um arranjo peculiar de três lóbulos, com os canais xilema e floema longe da epiderme. Na Figura 37, a imagem do lado esquerdo mostra uma estrutura muito compacta começando logo abaixo da epiderme, descartando estruturas sub-superficiais.

Além disto, mediu-se o ângulo de reflexão da luz sobre as hastes do capim dourado. Esta reflexão foi detectada com auxílio de um espectrofotômetro em diversos ângulos. Um *laser* diodo RGB foi afixado com um ângulo fixo de 45°, apresentado pela Figura 38.



*Figura 38: Esquema da montagem experimental para medida de refletância sobre as hastes de *S. nitens*. O suporte foi montado com goniômetro caseiro.*

Os resultados mostram que os três comprimentos de onda RGB que foram refletidos são praticamente especulares (Figuras 39, 40 e 41). Nenhum efeito de interferência ou difração foi detectado. Este resultado, juntamente com a imagem de MEV descartam a possibilidade de haver alguma estrutura periódica na superfície ou próxima da superfície que pudesse ser responsável pela colocação observada.

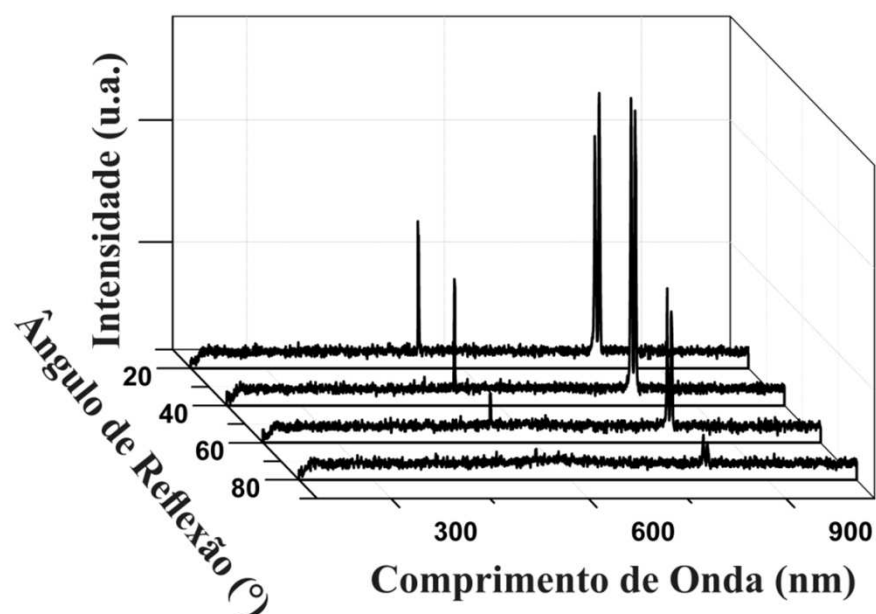


Figura 39: Espectro de refletância da luz de comprimento de onda referente à cor vermelha sobre a haste do capim dourado.

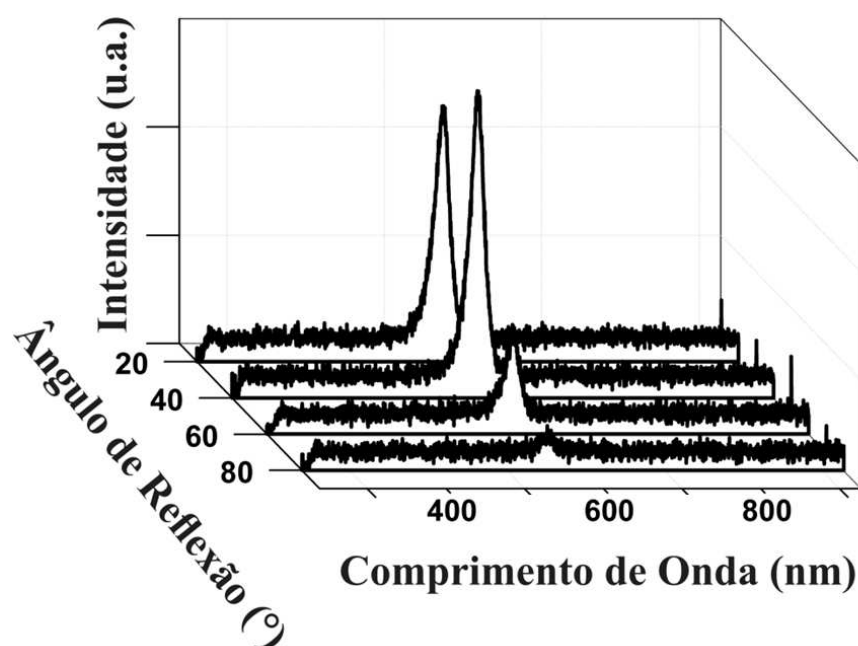
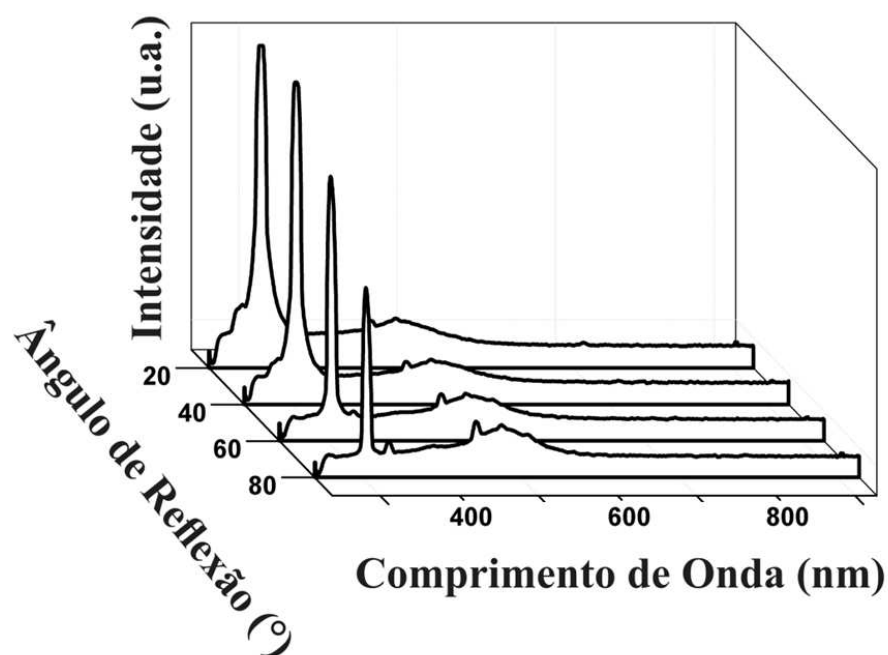


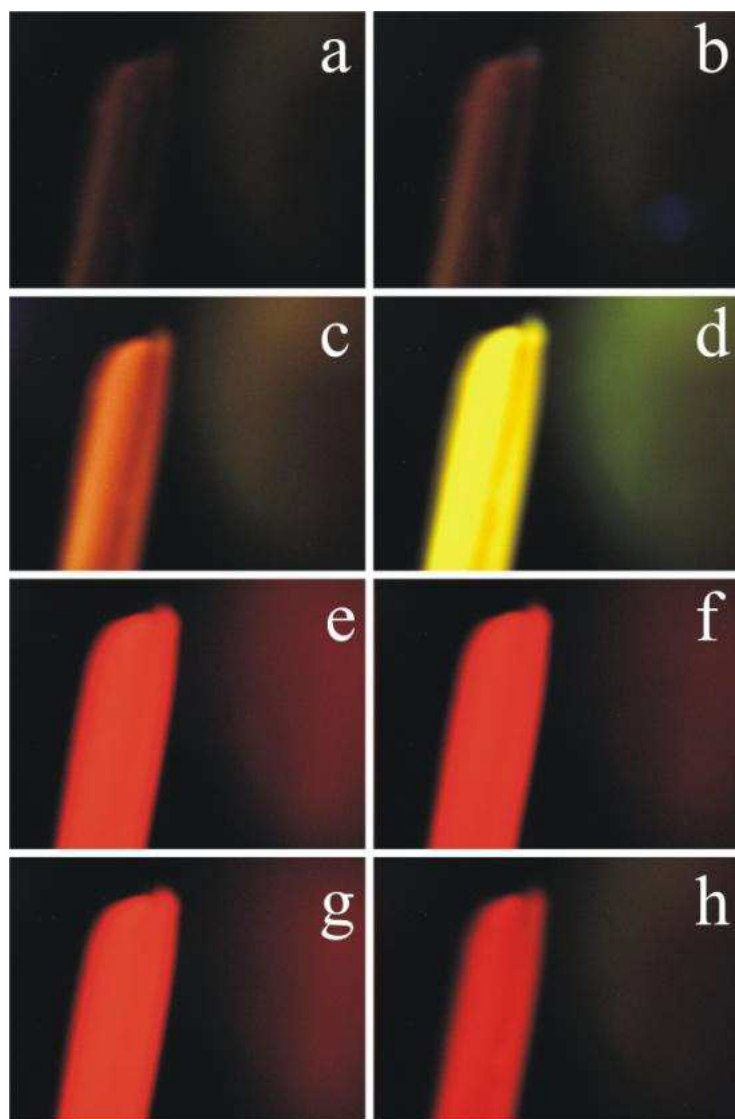
Figura 40: Espectro de refletância da luz de comprimento de onda referente à cor verde sobre a haste do capim dourado.



*Figura 41: Espectro de refletância da luz de comprimento de onda referente à cor azul sobre a haste do capim dourado, onde é observado um sinal de fluorescência em torno do comprimento de onda de 470 nm.*

Assim, a hipótese de que poderia haver alguma estrutura relacionada à interferência e iridescência [73] da luz foi refutada. A fluorescência do caule foi detectada por medidas de refletância e analisada posteriormente em um microscópio de fluorescência.

A Figura 42 mostra uma série de imagens da haste do capim dourado iluminada com diferentes comprimentos de onda, utilizando diversos filtros de excitação e emissão.



*Figura 42: Imagens de fluorescência da haste do S. nitens obtidas com excitações em diferentes comprimentos de onda e filtros de fluorescência. A superfície da haste emite fluorescência quando excitado em todos os comprimentos de onda, da luz UV (a) para vermelho (h).*

A fluorescência das hastes é estimulada por uma ampla gama de comprimentos de ondas, começando pelo ultravioleta (Figura 42a) até o vermelho (Figura 42h).

Como não foi encontrada nenhuma estrutura que venha causar efeitos de interferência relacionada aos efeitos de fluorescência e refletância, procurou-se investigar a respeito dos componentes orgânicos presentes na superfície da haste do capim, a celulose e a lignina.

Na Figura 43 são apresentados os espectros de absorção e fluorescência experimentais do extrato de *S. nitens* em água. Pode-se verificar que a suspensão absorve luz de alta frequência, principalmente na faixa do ultravioleta ao verde, fluorescendo na faixa desde o comprimento de onda referente à cor verde ao vermelho.

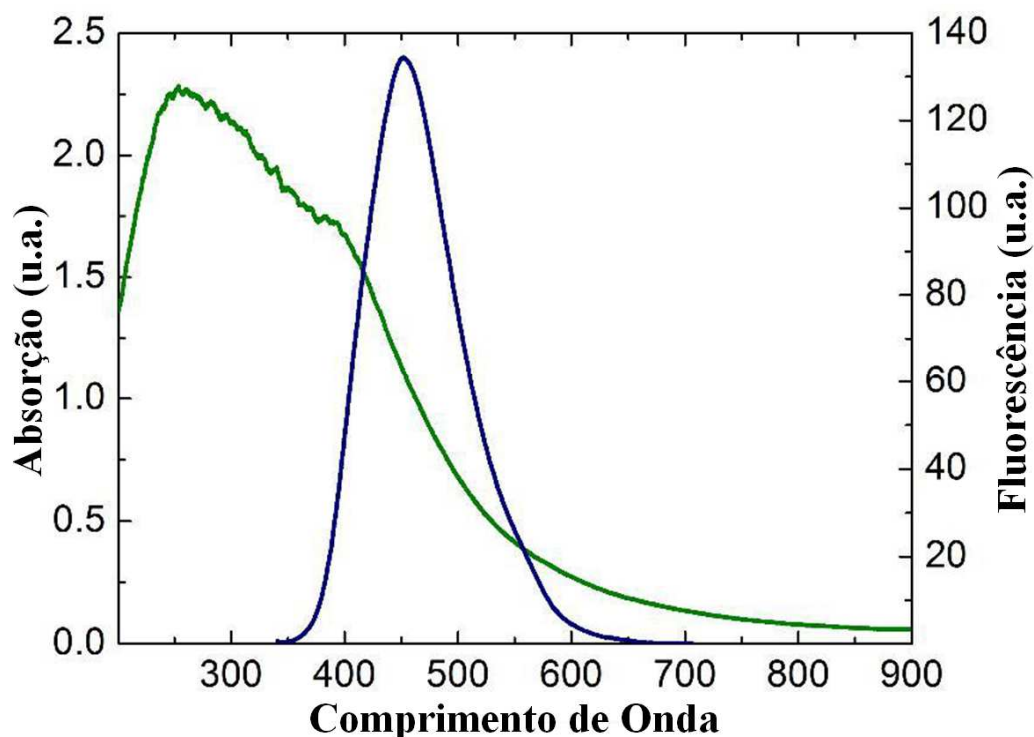


Figura 43: Espectro de absorção do extrato de *S. nitens* em água (curva em verde) e espectro de fluorescência (curva em azul) da mesma suspensão após excitação a 325 nm.

Esta larga emissão de fluorescência possui um valor máximo em 470 nm, quando a suspensão é excitada em diferentes comprimentos de onda, entre 225 nm e 375 nm. Assim, os extratos são capazes de absorver os comprimentos de onda curtos e emitirem em comprimentos de onda longos, com grandes desvios de Stokes. No caso do extrato de capim dourado, temos uma diferença do pico de absorção para o pico de emissão entre 245 nm e 95 nm. Desta forma, após extrair os flavonóides do *S. nitens* com auxílio de um solvente orgânico, no caso metanol, e deixando o solvente evaporar dentro de uma balão volumétrico, aplicou-se luz



ultravioleta de uma lâmpada “luz negra” comercial, cujo comprimento de onda varia de 315 nm a 400 nm (com pico em 365 nm) e observou-se o brilho de cor esverdeada descrito anteriormente. Esta fluorescência pode ser observada na Figura 44.



*Figura 44: Flavonóides extraídos e depositados no fundo de um balão volumétrico apenas sob a luz ambiente (à esquerda) e com aplicação de luz UV de 365 nm (à direita).*

#### **4.2.3 Simulação das propriedades fotofísicas dos flavonóides do extrato da haste de *S. nitens***

Nesta seção são apresentados os resultados teóricos, que ajudam a entender a origem da fluorescência do extrato de capim dourado, e que, posteriormente, são comparados à experimentação.

No extrato de *S. nitens* são encontradas muitas moléculas semelhantes, as quais foram descritas em detalhe por Pacifico *et al.* [29]. Para entender as absorções características do extrato de capim dourado, apresentado na Figura 43, foram realizados cálculos teóricos *ab*

*initio* destas moléculas, as quais foram identificadas como sendo flavonóides. São 8 flavonóides, sendo 5 flavonas e 3 flavanonas. As respectivas numerações e suas identificações são apresentadas na Tabela 3, conforme Pacifico *et al.* [29].

Tabela 3: Numeração e identificação dos 8 flavonóides descritos por Pacifico *et al.*

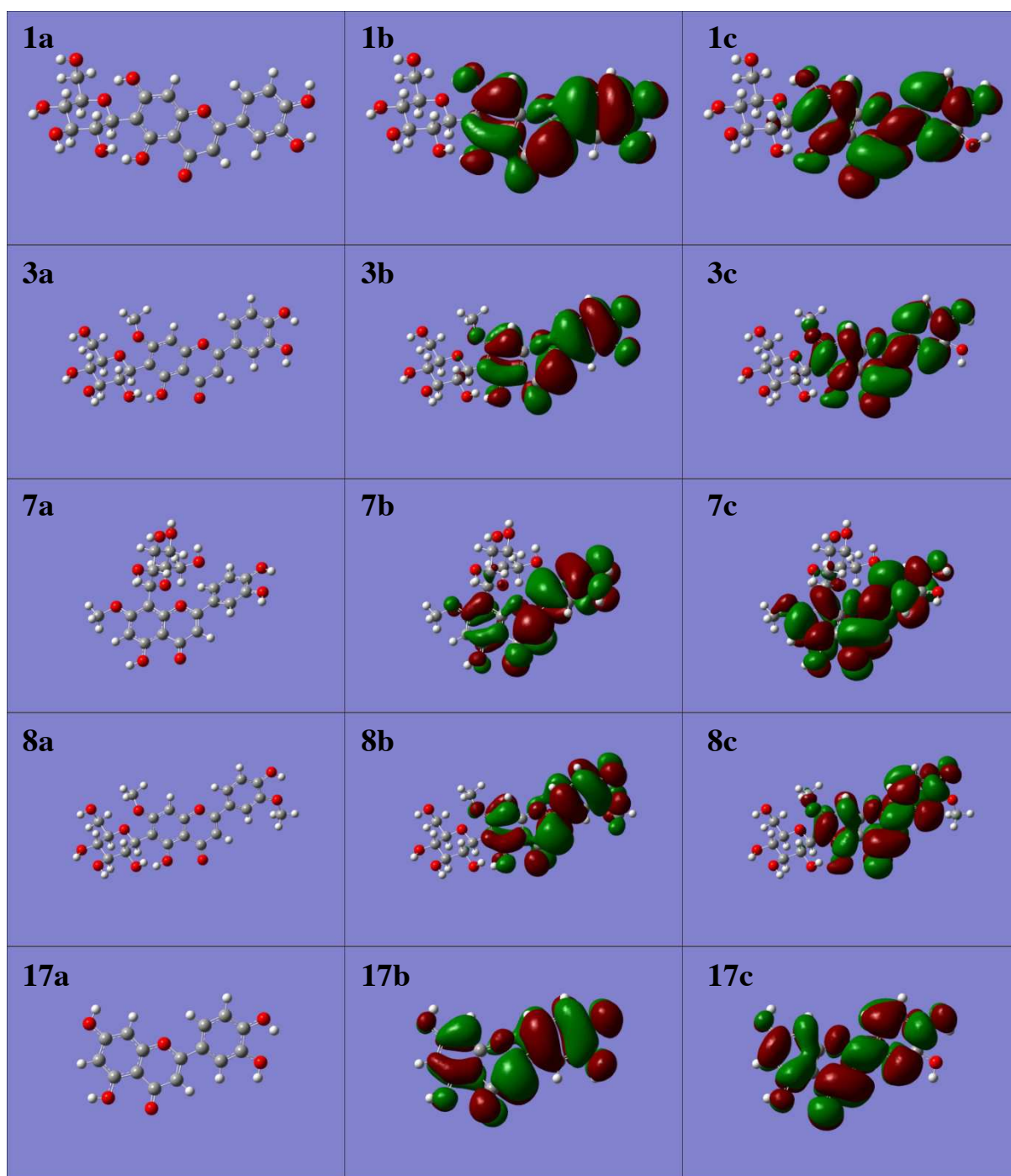
|           |   |
|-----------|---|
| <b>1</b>  | 3',4',5,-tetrahidroxi-6-C-glucopiranosilflavona           |
| <b>3</b>  | 3',4',5,-trihidroxi-7-metoxi-6-C- glucopiranosilflavona   |
| <b>5</b>  | 3',4',5,-trihidroxi-7-metoxi-6-C- glucopiranosilflavanona |
| <b>7</b>  | 3',4',5,-trihydroxy-7-metoxi-8-C- glucopiranosilflavona   |
| <b>8</b>  | 4',5,-dihidroxi-3',7-dimetoxi-6-C- glucopiranosilflavona  |
| <b>9</b>  | 3',4',5,-trihidroxi-7-metoxi-8-C- glucopiranosilflavanona |
| <b>10</b> | 4',5,7-trihidroxi-8-C- glucopiranosilflavanona            |
| <b>17</b> | 3',4',5,7-tetrahidroxiflavona                             |

Além das transformações fotoquímicas que os flavonóides podem sofrer devido à sua exposição à luz solar ao longo do dia, estes compostos também podem transferir a energia da luz para outras moléculas ou aceitar a energia de outras moléculas, ou seja, atuam como sensibilizadores ou supressores. A transformação fotoquímica requer excitação de um elétron de um orbital no estado fundamental para um orbital no estado excitado. Isto é geralmente decorre da absorção de luz ultravioleta por um cromóforo. Todos os flavonóides têm cromóforos aromáticos, como indicados pelas absorções de UV na região em torno de 250 nm de seus espectros [74]. Esses compostos podem sofrer excitação do tipo  $\pi-\pi^*$  e reagir de estados excitados  $\pi-\pi^*$ . Alguns flavonóides contêm cromóforos carbonila e absorvem a luz na região de 300 nm. Cromóforos carbonila, que são conjugados com o anel aromático, absorvem a luz UV na região de 350 nm [74]. Os estados excitados  $n-\pi^*$  e  $\pi-\pi^*$  destes compostos são quase degenerados e os estados das quais suas reações de originam às vezes é

controversa [74], podem ser ou não ser excitações de orbitais moleculares HOMO para LUMO diretamente. As moléculas que não possuem cromóforos e não podem absorver a energia da luz podem ser excitadas indiretamente através de sensibilização, envolvendo, assim, a transferência da maior parte da energia do estado tripleto.

As flavonas estudadas apresentam, majoritariamente, comportamento típico de excitação do tipo  $\pi\text{-}\pi^*$ , pois visivelmente seus orbitais moleculares no estado fundamental e estado excitado permanecem sobre um mesmo conjunto atômico.

A Figura 45 mostra as geometrias otimizadas de 5 dos 8 flavonóides estudados, os quais são do tipo flavona e são encontrados no extrato das hastes de *S. nitens*. A figura mostra também a representação gráfica das densidades eletrônicas em seus estados fundamental HOMO (*highest occupied molecular orbital*) e em seus estados excitado LUMO (*lowest unoccupied molecular orbital*), no centro e à direita da figura, respectivamente.



*Figura 45: Geometria otimizada dos flavonóides 1, 3, 7, 8 e 17 (à esquerda) com suas respectivas densidades eletrônicas dos orbitais moleculares HOMO (b) e LUMO (c), onde observa-se baixa redistribuição de carga. Os átomos estão representados com as cores: cinza – carbono, branco – hidrogênio e vermelho – oxigênio.*

As flavanonas estudadas aqui neste trabalho possuem um comportamento majoritariamente do tipo transferência de carga interna. Pode-se verificar isto pela presença dos orbitais moleculares HOMO e LUMO, os quais mudam de grupamentos atômicos. A flavanona 3',4',5,-trihidroxi-7-metoxi-6-C-glucopiranosilflavanona, das três apresentadas a seguir, é a que menos apresentou transferência de carga interna, demonstrando indícios de excitação do tipo  $\pi-\pi^*$ . Mesmo com este indício pode-se notar que a densidade dos orbitais migra quase que inteiramente para o grupamento do duplo anel. Assim, a Figura 46 mostra as geometrias otimizadas de 3 flavonóides estudados, os quais são do tipo flavanona e são encontrados no extrato das hastes de *S. nitens*. A figura mostra também a representação gráfica das densidades eletrônicas em seus estados fundamental HOMO e em seus estados excitado LUMO (os quais “migram” para a região central da molécula) no centro e à direita da figura, respectivamente.

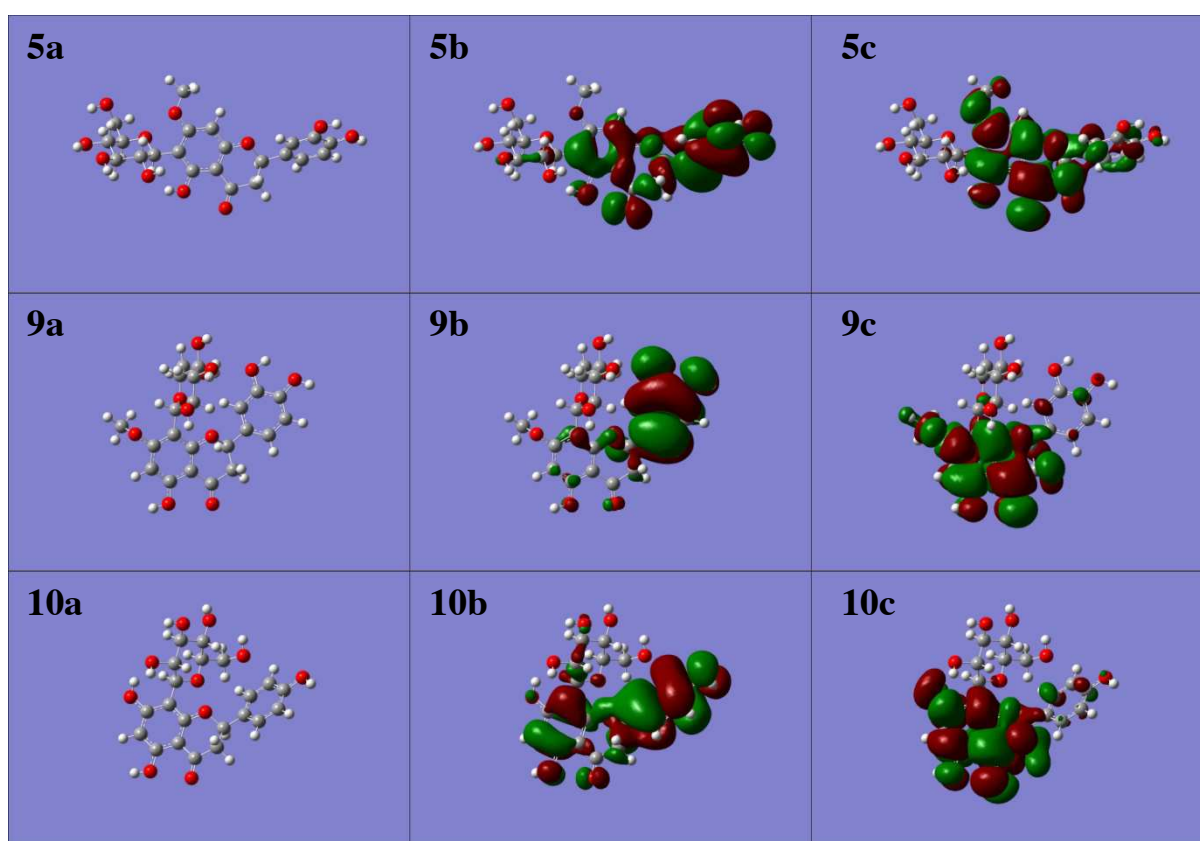


Figura 46: Geometria otimizada dos flavonóides 5, 9 e 10 (à esquerda) com suas respectivas densidades eletrônicas dos orbitais moleculares HOMO (b) e LUMO (c), onde observa-se alta redistribuição de carga. Os átomos estão representados com as cores: cinza – carbono, branco – hidrogênio e vermelho – oxigênio.

Os espectros teóricos de absorção dos elétrons de transição entre os estados fundamental e excitado obtidos da simulação são mostrados na Figura 47, onde dois grupos distintos foram identificados. As flavonas possuem duas absorções bem expressivas, uma centrada em 250 nm e outra em 350 nm, aproximadamente. As flavanonas possuem apenas uma absorção expressiva, centrada em 250 nm, a outra absorção, menos intensa, é deslocada para o azul, centrada em torno de 320 nm.

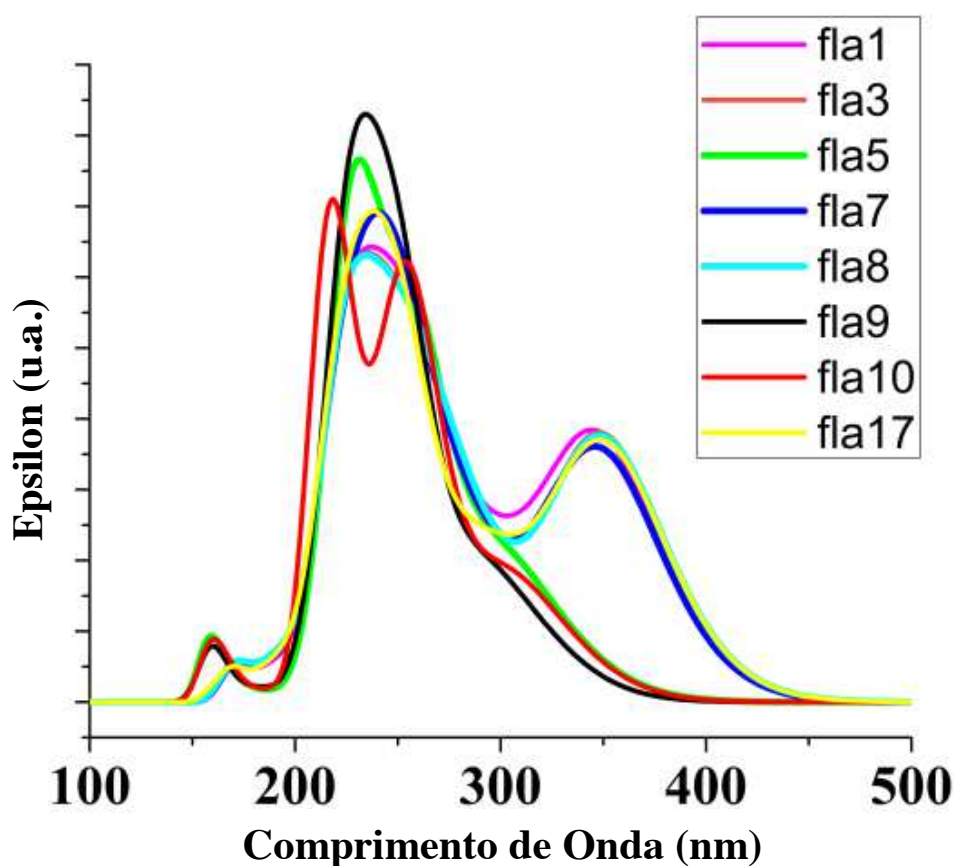


Figura 47: Os espectros de absorção calculados teoricamente para as 8 flavonóides encontrados e descritos anteriormente por Pacifico et al.[29], onde o eixo y é o Coeficiente de Absortividade Molar ( $\epsilon$ ).

Todos os flavonóides apresentaram componentes relativamente altas para as forças de oscilador na região do ultravioleta. As flavonas 1, 3, 7, 8 e 17 apresentaram componentes da

força de oscilador adicionais na região azul do espectro. No entanto, a mistura de flavonóides deve absorver luz desde 200 nm a 450 nm, de acordo com estes resultados teóricos.

#### 4.2.4 Interpretação da cor dourada do *S. nitens*

A Figura 48 mostra o espectro solar (azul), feita ao meio-dia do dia 14 de setembro de 2012 em Curitiba, e os espectros de transmissão do extrato de *S. nitens* (preto). Em verde é mostrado o espectro de refletância da luz solar refletida com um ângulo 45°, obtidos na mesma data e local. Para a obtenção do espectro referente à curva amarela multiplicou-se o espectro solar pelo espectro de transmissão nos extratos de capim dourado, o qual foi comparado com o espectro da refletância da luz solar. Nota-se uma concordância notável entre as curvas amarela e verde.

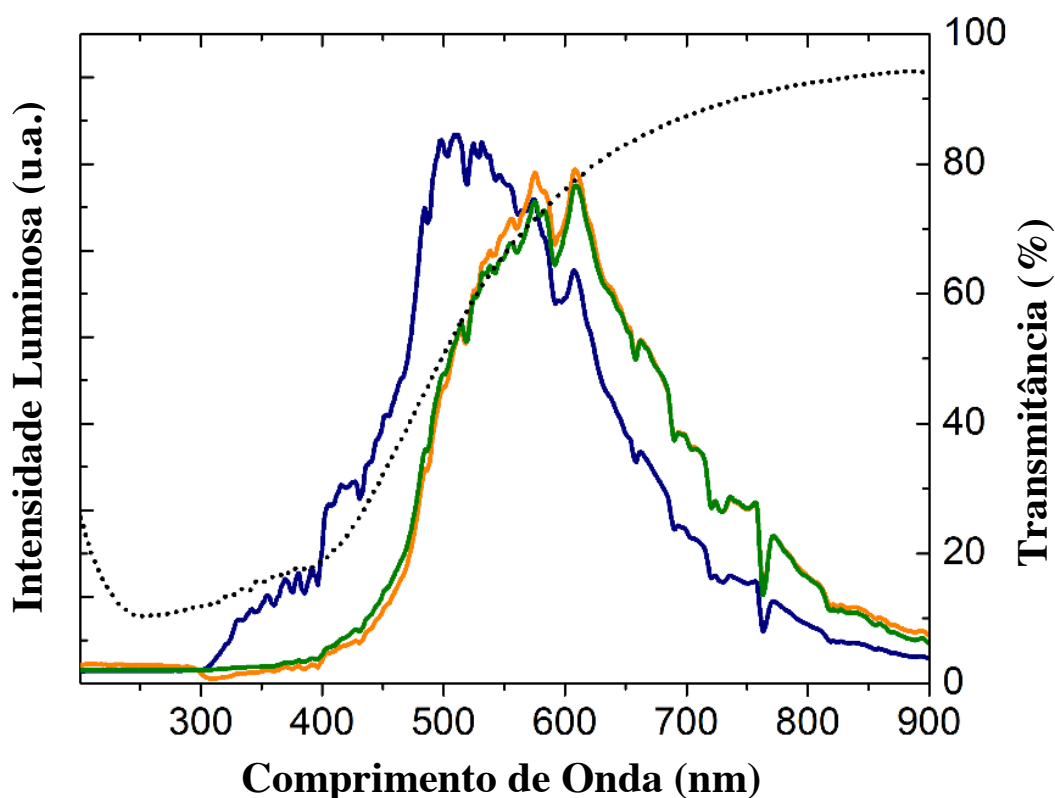


Figura 48: Os quatro espectros mostrados são: espectro solar em um dia ensolarado no sul do Brasil (linha azul); o espectro de transmissão do extrato de *S. nitens* (linha preta pontilhada); o espectro experimental de refletância do *S. nitens* (linha verde); e a curva resultante (amarela) depois da multiplicação do espectro solar pelo espectro de transmissão.



Outra comprovação do efeito dos flavonóides está comprovada na Figura 49, onde comparamos a transmitância pelos extratos com a refletância normalizada pelo espectro solar a 45°.

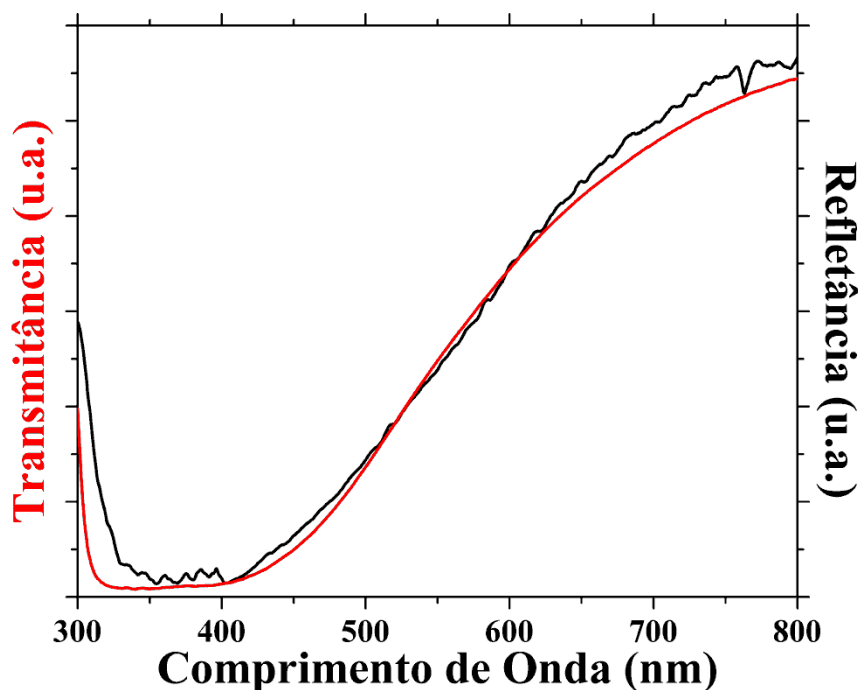


Figura 49: Espectros de transmitância da luz total do extrato (vermelho) e da refletância a 45° da haste de *S. nitens*.

Conclui-se, portanto, que o comportamento óptico (reflexão e absorção) apresentado pelo capim dourado é devido aos flavonóides.

#### 4.2.5 Fotodegradação e transferência de energia entre flavonóides no extrato de *S. nitens*

Uma característica importante dos fluoróforos em dispositivos de diagnósticos é a baixa capacidade de se degradar ou a completa não-degradação por raios ultravioleta. Atualmente os agentes de marcação convencionais têm várias limitações causadas por suas propriedades intrínsecas, como a fotodegradação e fraca estabilidade fotoquímica [75]. Desta forma, procurou-se verificar a estabilidade da fluorescência do extrato de *S. nitens*, o qual não apresentou mudanças significativas durante a exposição à luz de comprimento de onda de



337 nm gerada por *laser*. O extrato fluorescente ficou exposto continuamente durante 6 horas e praticamente não houve fotodegradação, visto na Figura 50.

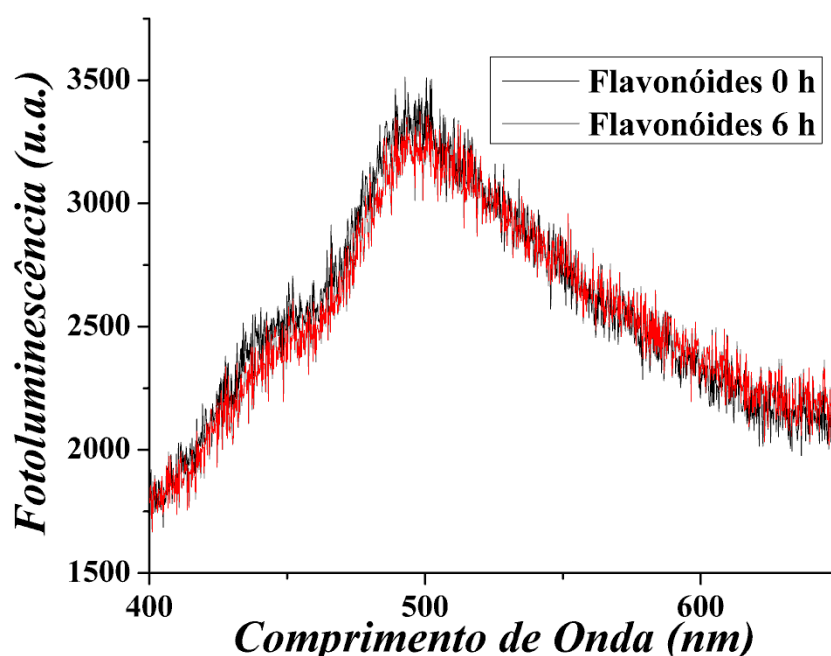
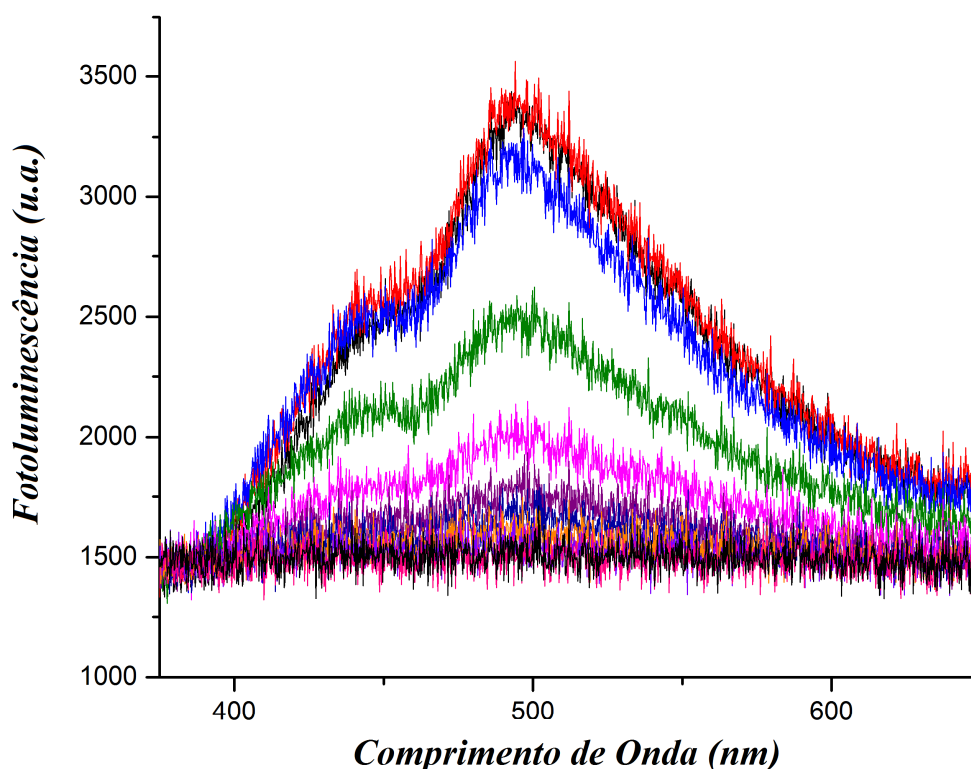


Figura 50: Gráfico da fotoluminescência do extrato de capim dourado após excitação a 337 nm. Em preto, a curva da fluorescência do extrato de capim dourado com pouco tempo de exposição e, em vermelho, a curva do extrato exposto continuamente durante 6 horas.

Foi realizado um estudo do efeito da diluição sobre a emissão do extrato de *S. nitens*, a fim de verificar a taxa de diminuição causada pelo espaçamento intermolecular devido ao solvente. Como estes flavonóides foram extraídos em metanol, utilizou-se o mesmo. Este estudo aponta para a causa físico-química da fotoluminescência do extrato de capim dourado, já que a utilização da transferência de energia como um indicador de proximidade mostra uma característica importante da transferência de energia. A transferência de energia pode ser assumida, de forma confiável, a ocorrer sempre que os doadores e receptores estão dentro da distância característica de Förster e sempre que ocorra sobreposição espectral adequada [32], como mostra a Figura 43. Esta diminuição da fluorescência com o aumento da diluição é apresentado na Figura 51.



*Figura 51: Espectro de emissão do extrato de *S. nitens* em metanol após excitação a 337 nm. Com o aumento do solvente, na proporção de 50% em 50%, a fotoluminescência diminui.*

A transferência de energia por ressonância é um processo que não envolve a emissão e reabsorção de fótons. A teoria da transferência de energia é baseada no conceito de que um fluoróforo, como um dipolo oscilante, pode trocar energia com outro dipolo com uma frequência de ressonância semelhante. Assim, estudou-se o comportamento dos flavonóides do capim dourado em função da distância entre eles mesmos quando dispersos em um solvente orgânico.

Como eficiência de transferência de energia é a fração de fótons absorvidos pelo doador que são transferidos para o receptor, então se obteve a Figura 52.

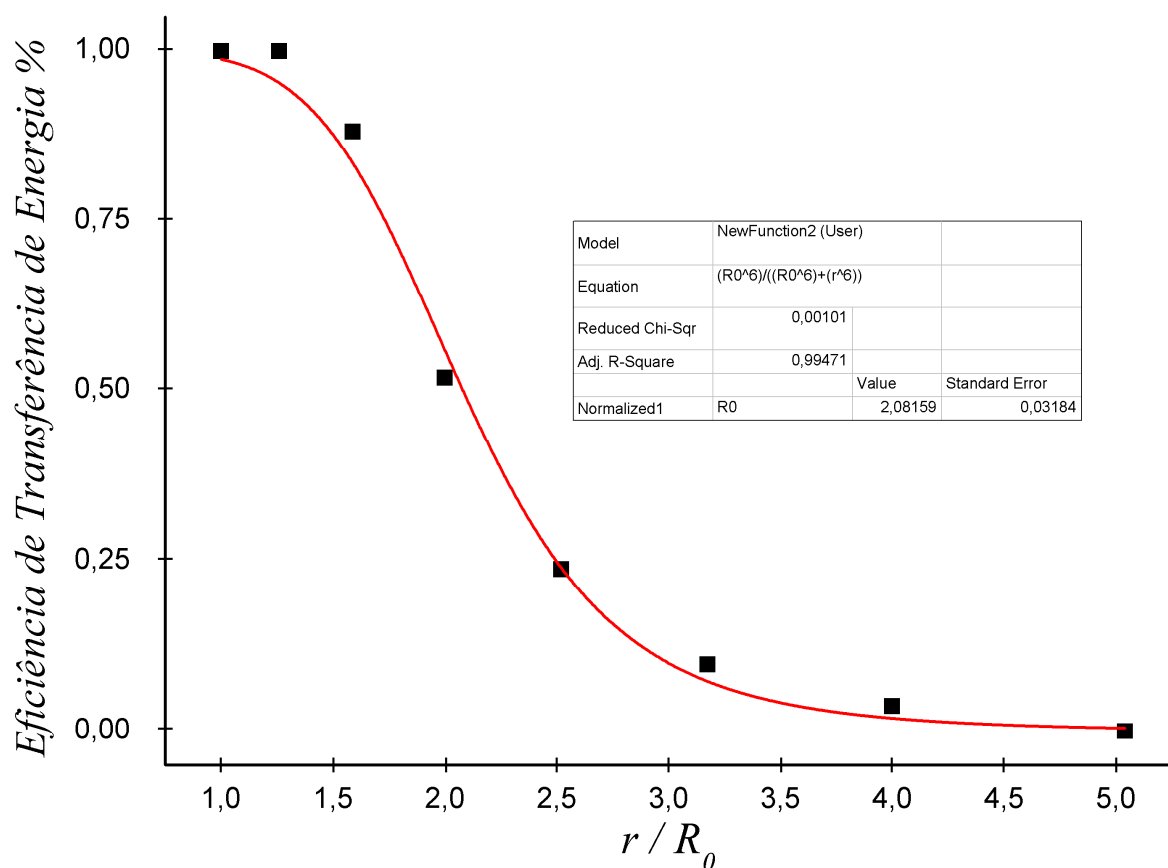


Figura 52: Eficiência de transferência de energia pela razão  $r / R_0$  do capim dourado dissolvido em metanol.

Desta forma obteve-se a razão  $r / R_0$ , onde  $R_0$  é o raio de Förster e  $r$  a distância intermolecular volumétrica, comparou-se com os resultados obtidos a partir das Figuras 43 e 51. Ajustando a curva teórica à curva experimental obtida, a partir da equação (3), dada por

$$E = \frac{R_0^6}{R_0^6 + r^6} \quad , \quad (3)$$

encontra-se um valor de  $R_0 = 20,8 \text{ \AA}$ .

Como a transferência de energia não-radiativa é eficaz ao longo de distâncias muito longas, o solvente tem pouco efeito sobre a eficiência de transferência de energia, que depende principalmente da distância do doador para o receptor [32]. Estes resultados mostram que o mecanismo envolvido no estudo da fluorescência do extrato de *S. nitens* é, de fato, FRET (*Förster Resonance Energy Transfer*), um mecanismo que transfere energia para um cromóforo receptor nas imediações através do acoplamento dipolo-dipolo não radiativo. A Figura 52 prova esta hipótese, que o mecanismo de fluorescência do capim dourado é transferência de energia por ressonância, não havendo trocas energéticas muito significativas pelo fenômeno colisional.

#### 4.2.6 Fluorescência do extrato de *S. nitens* com a adição de nano-partículas de ouro

Nesta seção serão apresentados os resultados da supressão da fluorescência devido às nano-partículas de ouro, fundamental no método de detecção em imunodiagnósticos.

O comportamento da fotoluminescência do extrato de capim dourado em meio a nano-partículas também foi observado. O experimento foi conduzido adicionando-se 0,05 ml de uma solução de nano-partículas de ouro e metanol ao extrato de capim dourado, cuja concentração era de  $10^{-3} \text{ mol.L}^{-1}$ . Também foi realizado um experimento adicionando-se 0,05 ml de metanol ao extrato de capim dourado. Então, foram gerados dois gráficos a partir destes resultados, um para a diminuição da fluorescência devido às nano-partículas e outro devido a algum efeito do solvente. Com estes conjuntos de dados foi gerado um terceiro gráfico, tal que o efeito de diluição foi excluído e verificou-se apenas o efeito dos supressores de fluorescência sobre os fluoróforos. Este gráfico é apresentado na Figura 53.

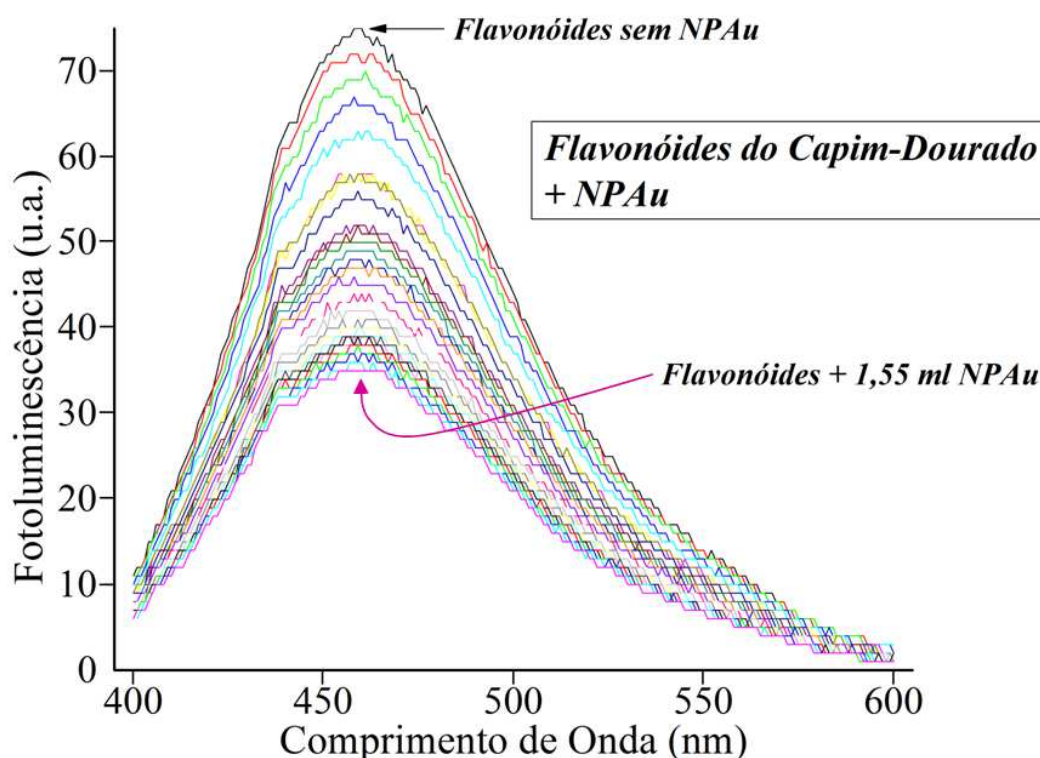


Figura 53: Diminuição da fotoluminescência do extrato da haste do capim dourado em função do aumento da concentração de nano-partículas de ouro.

Quando todos fluoróforos são igualmente acessíveis ao *quencher* em questão, observa-se um gráfico linear de Stern-Volmer, como é descrito com mais detalhes na fundamentação teórica do presente trabalho na página 19. Este comportamento é indicativo de uma única classe de fluoróforos, ou seja, fluoróforos que possuem um mesmo comportamento perante o supressor da fluorescência [32]. Assim, como mostra a Figura 54, gerou-se um gráfico  $F_0/F$  pela concentração de nano-partículas de ouro, onde  $F_0$  e  $F$  são as intensidades da fluorescência na ausência e presença de *quenchers*, respectivamente.

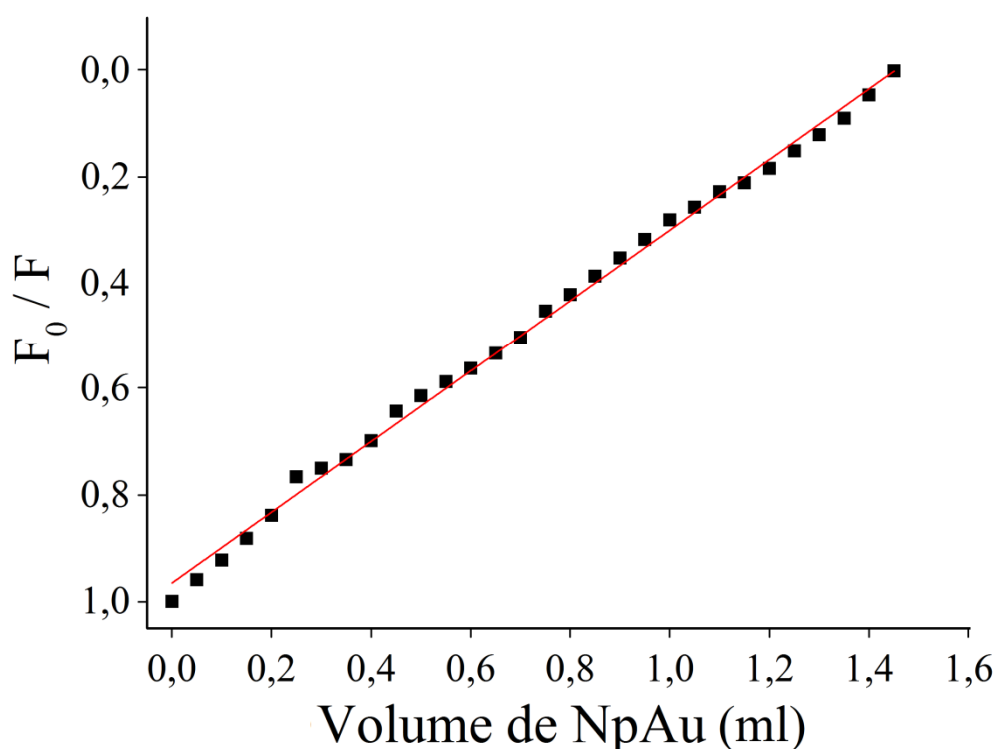


Figura 54: Razão entre a intensidade de fluorescência dos flavonóides do capim dourado e o aumento da concentração de nano-partículas de ouro (Relação de Stern-Volmer).

Este gráfico linear de Stern-Volmer prova que com a presença de nano-partículas a fluorescência dos flavonóides é suprimida e, com um aumento significativo destas, o *quenching* pode levar a fluorescência a zero, suprimindo-a completamente.

Os mesmos procedimentos de estudos das propriedades opto-eletrônicas foram utilizados no estudo da quercetina e sakuranetina, apresentados na seção seguinte.

### 4.3 Quercetina e Sakuranetina

A quercetina e a sakuranetina utilizadas para as medidas apresentadas no presente trabalho são produzidas industrialmente e comercializadas pela *Sigma-Aldrich*<sup>®</sup>. Como dito anteriormente, estes flavonóides foram escolhidos devido às suas semelhanças estruturais com os flavonóides da haste do capim dourado (que são 5 flavonas e 3 flavanonas). Os dois flavonóides escolhidos são apresentados na Figura 55.

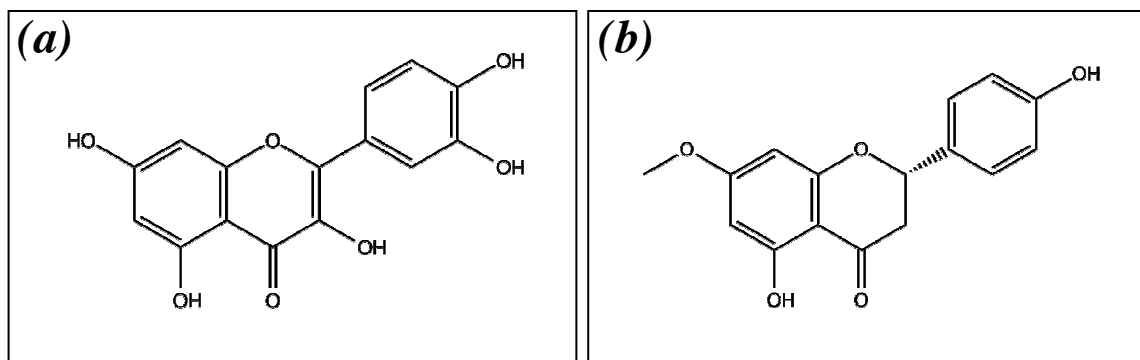


Figura 55: Fórmula estrutural da quercetina (a) e sakuranetina (b).

A quercetina e a sakuranetina são flavonóides de duas espécies, flavonol e flavanona. A quercetina, quando sintetizada, pode ser obtida a partir de uma flavona, os quais se diferem em apenas um grupo substituinte OH [76].

A quercetina ( $C_{15}H_{10}O_7$ ) é um de um grupo de mais de 4.000 compostos fenólicos de plantas naturalmente disponíveis, cujo isolamento e identificação biológica foram descritos pela primeira vez por Szent-Gyorgyi em 1936. Os flavonóides são estudados há muito tempo, mas na alimentação primeiramente foram identificadas como vitamina P, e, juntamente com a vitamina C, foram consideradas importantes para a manutenção da integridade da parede capilar e da resistência capilar. Posteriormente, outras propriedades relevantes foram atribuídas aos flavonóides, como atividade anti-hipertensiva e antiarrítmica, antiinflamatória

e propriedades antialérgicas, hipocolesterolêmicas, anticarcinômicas e antitumorais [77]. Os flavonóides têm uma longa história evolutiva na fisiologia da planta. Eles respondem à luz e são conhecidos por controlar o nível de auxina, os reguladores de crescimento e diferenciação da planta. Em fábricas de alimentos, os flavonóides dão cor, textura e sabor. Algumas funções biológicas adicionais em plantas incluem atividade antifúngica e bactericida [78]. Muitos dos papéis biológicos desempenhados pelos flavonóides estão associados com as suas capacidades de ligação a metais como ferro e cobre, que podem agir como bloqueadores antioxidantes e proteção ultravioleta. Da mesma forma, a sakuranetina também possui propriedades biológicas de interesse científico e medicinal [79].

A sakuranetina ( $C_{16}H_{14}O_5$ ) foi obtida pela primeira vez em 1949 a partir da casca de *Prunus puddum*, onde estava presente como 1% por peso [77]. Seu glicosídeo, sakuranina, foi isolado pela primeira vez por Asahina, Shinoda e Inubuse em 1927 a partir da casca de *Prunus pseudo-cerasus*, uma espécie de árvore cerejeira nativa do leste asiático [77], conhecida como *Sakura* (em japonês 桜). Sakuranetina foi encontrada mais tarde em associação com um grande número de outros flavonóides e glicosídeos na madeira de uma série de outras espécies de cerejeiras, a *Prunus*, *P. aequinoctialis*, *P. nipponica*, *P. maximowiczii* e *P. verecunda* [77].

### 4.3.1 Absorção e Fluorescência: Experimental

Nesta seção são apresentadas as medidas de fluorescências e absorções da quercetina e sakuranetina, as quais servem como comparação com os flavonóides encontrados na haste do *S. nitens*, pois estes não foram possíveis de serem estudados individualmente. A parte teórica desta parte do trabalho será abordada na seção posterior a esta.

Na Figura 56, são observadas as absorções ópticas da quercetina e sakuranetina. Estes resultados mostram que o comportamento da absorção destas duas moléculas é semelhante, pois apresentam dois picos. Estes picos situam-se em 257 nm e 374 nm para a quercetina e 263 nm e 334 nm para a sakuranetina.

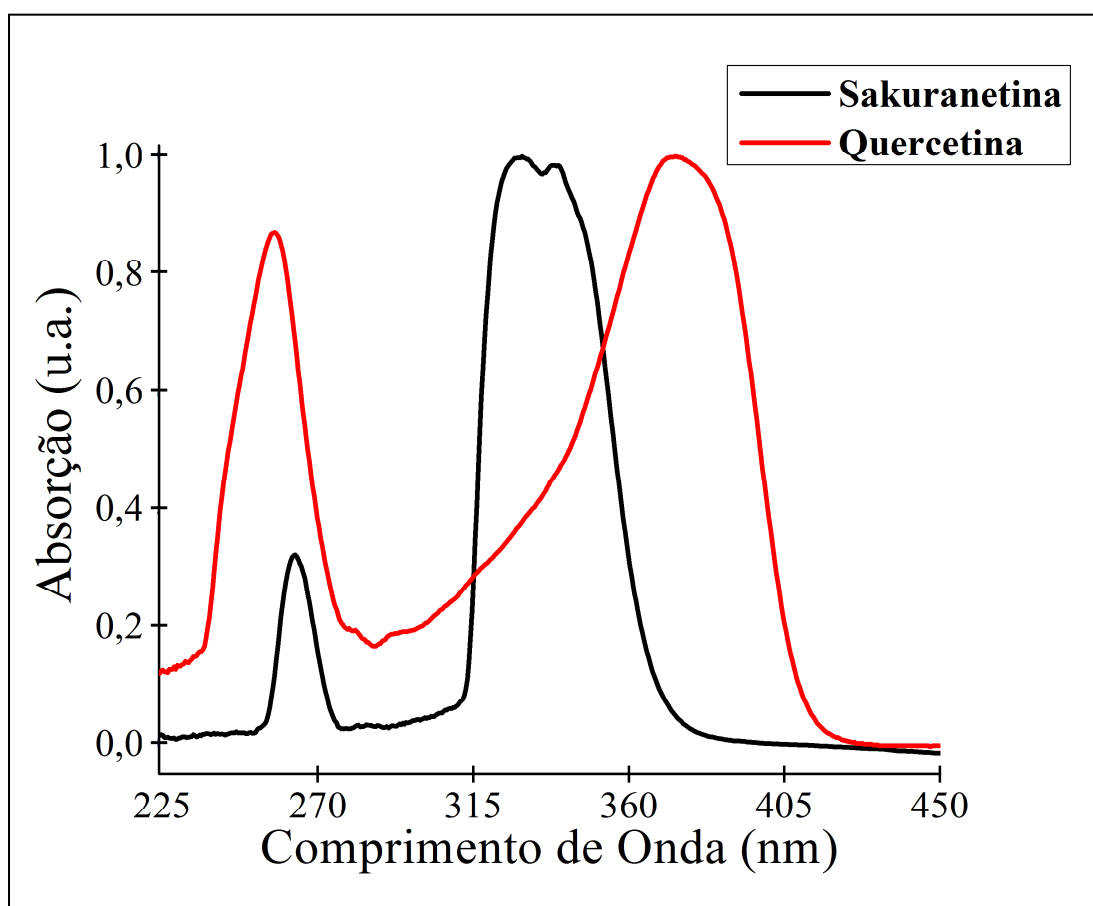


Figura 56: Espectro experimental da absorção pelo comprimento de onda da sakuranetina e quercetina.



A Figura 57 mostra o espectro de fluorescência da quercetina e da sakuranetina quando excitadas por um laser de comprimento de onda de 337 nm.

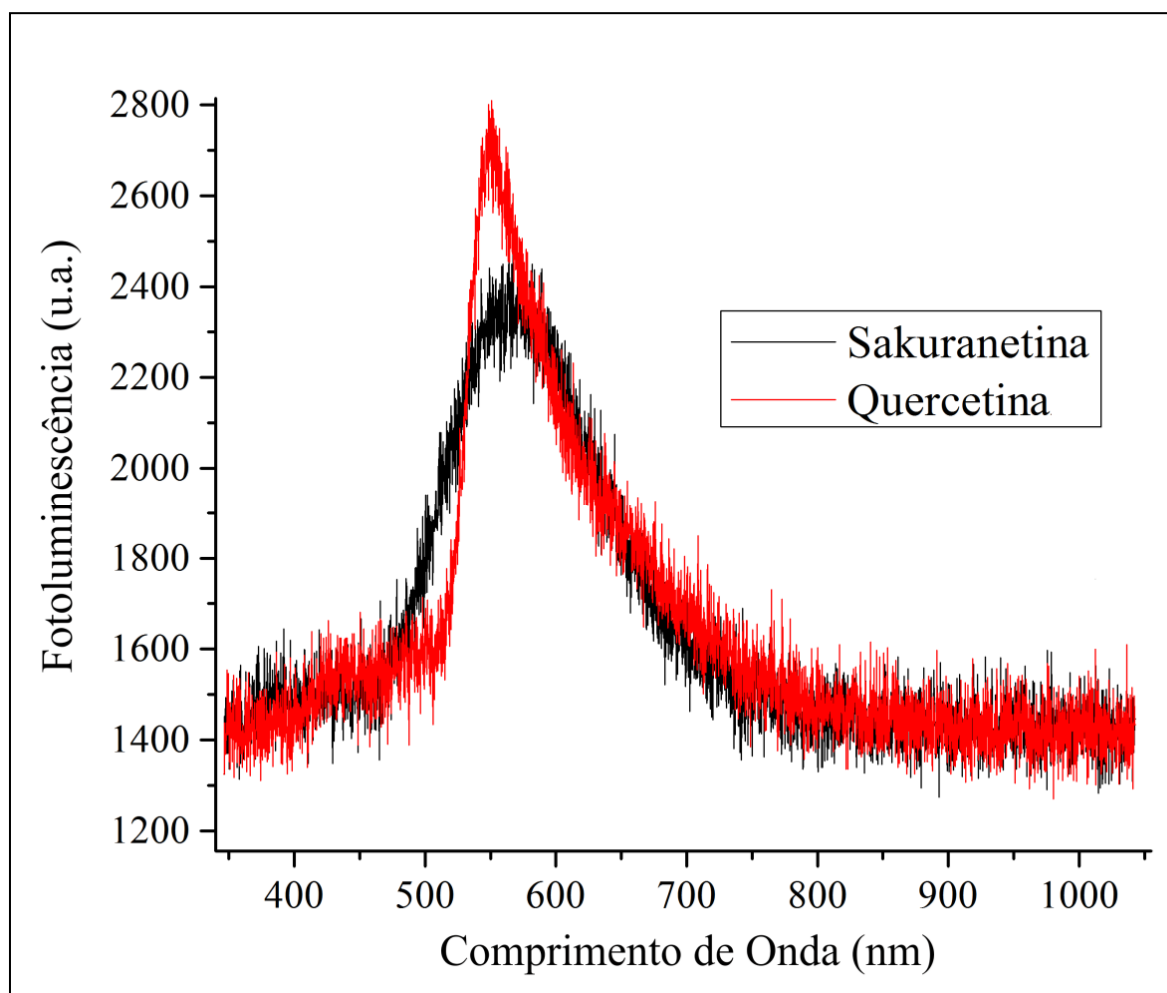


Figura 57: Espectro de fluorescência da quercetina e sakuranetina após excitação a 337 nm.

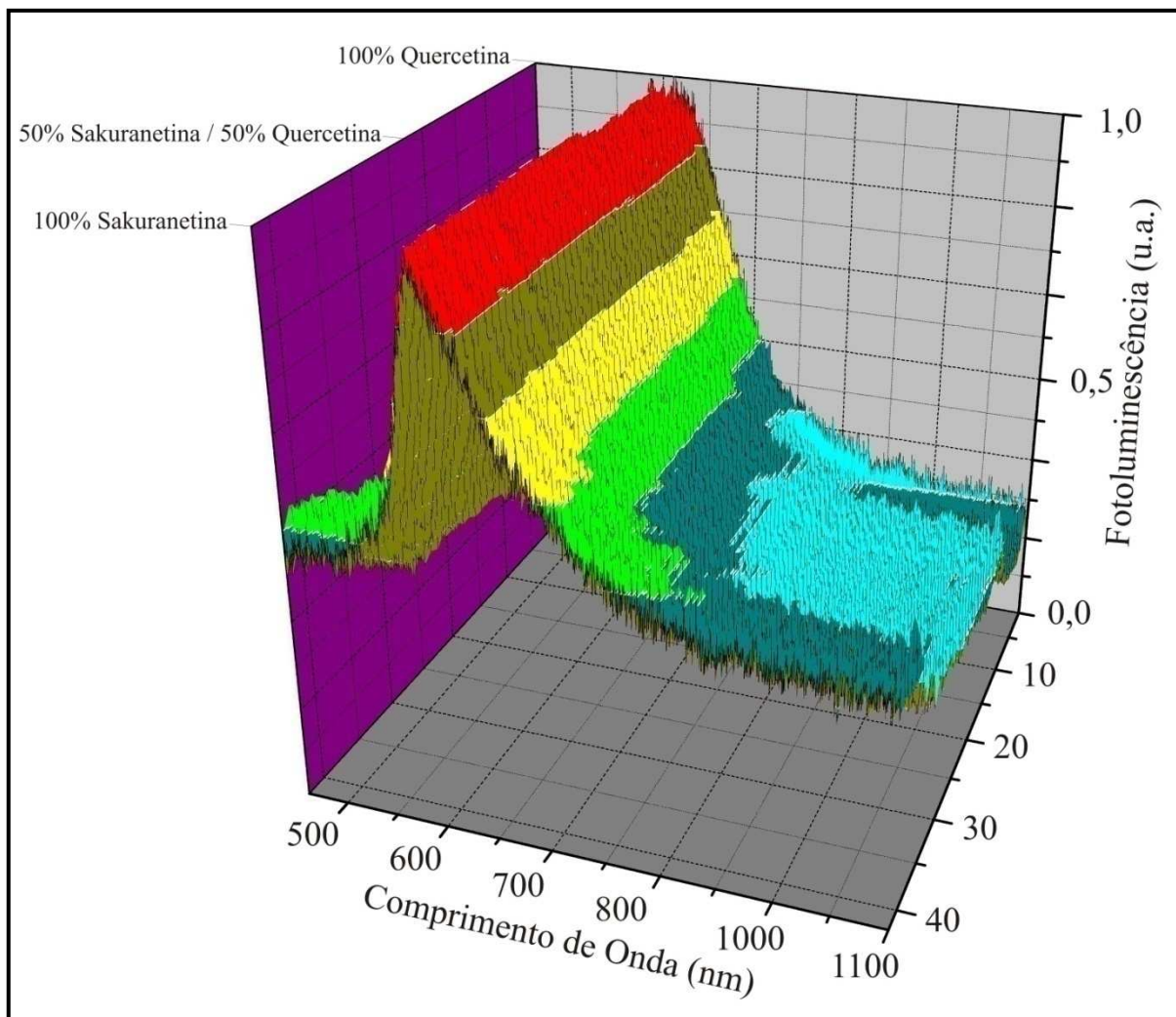
Estes dois flavonóides, diferentes dos encontrados no *S. nitens*, possuem uma cor laranja-amarela. Apesar desta diferença de coloração, a importância deste experimento era verificar se havia alguma luminescência quando excitadas próximo de suas absorções. Desta forma a quercetina e a sakuranetina apresentaram emissão máxima no comprimento de onda 549 nm e 567 nm, respectivamente. Esta fluorescência pode ser vista na Figura 58.



*Figura 58: Emissão da quercetina quando excitada com uma lâmpada UV comercial.*

Com a quantidade de espécies de flavonóides contidos na haste do *S. nitens* era de se esperar que um tivesse influência sobre a fluorescência do outro. Como não possuímos técnicas para separá-los e estudá-los individualmente, decidiu-se por fazer uma mistura de quercetina com sakuranetina e observar se havia alguma modificação no espectro de emissão quando a solução migra de uma concentração de 100% de sakuranetina e 0% de quercetina para 0% de sakuranetina e 100% de quercetina. Esta possível influência de um fluoróforo para o outro, que ocasionaria algum aumento, diminuição ou até deslocamento no comprimento de onda, não foi observada. A Figura 59 mostra a transição destes dois

espectros de uma proporção de 100%-0% para 0%-100% de sakuranetina e quercetina, respectivamente.



*Figura 59: Transição das fluorescências da sakuranetina e da quercetina quando feita a mistura das duas gradualmente de 2% em 2%, da solução inicial de 100% de sakuranetina/0% de quercetina até a obtenção de 0% de sakuranetina/100% de quercetina.*

Com estes resultados nota-se que não há influência significativa nas fluorescências de uma espécie de flavonóide para a outra, já que durante as misturas de sakuranetina com quercetina as curvas de fluorescência sofreram apenas uma transição de uma para a outra.

### 4.3.2 Simulação e otimização teórica

Nesta seção são apresentados os resultados teóricos, que ajudam a entender a fluorescência da quercetina e da sakuranetina, são comparados à experimentação e com os resultados teóricos obtidos para os flavonóides da haste do capim dourado.

As Figuras 60 e 61 mostram a geometria otimizada da quercetina e sakuranetina, os quais são um flavonóide do tipo flavonol e outro flavanona, respectivamente. As figuras mostram também as representações gráficas das densidades eletrônicas em seus estados fundamental HOMO (*highest occupied molecular orbital*) e em seus estados excitado LUMO (*lowest unoccupied molecular orbital*), no centro e à direita da figura, respectivamente.

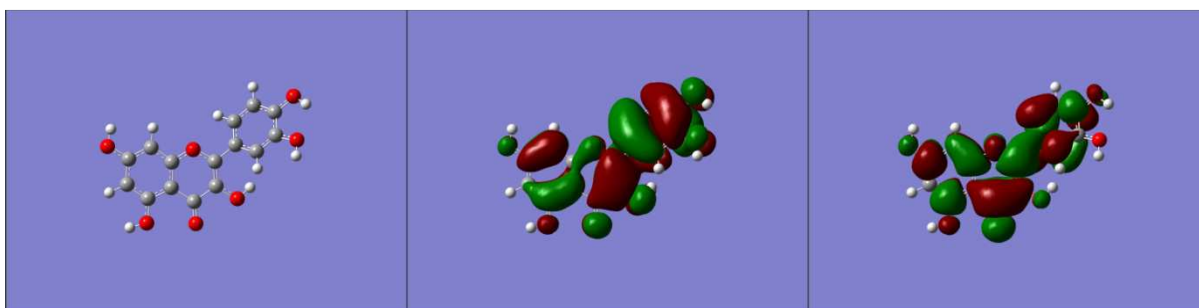


Figura 60: Geometria otimizada da quercetina (à esquerda) com suas respectivas densidades eletrônicas dos orbitais moleculares HOMO (meio) e LUMO (direita), onde observa-se baixa redistribuição de carga. Os átomos estão representados com as cores: cinza – carbono, branco – hidrogênio e vermelho – oxigênio.

Assim como os orbitais HOMO e LUMO das 5 flavonas da haste do capim dourado, os orbitais HOMO e LUMO da quercetina mostraram uma baixa redistribuição de carga,

característico de uma transição  $\pi-\pi^*$  e, no caso da sakuranetina, pode-se observar transferência de carga interna, como ocorrido com as 3 flavanonas apresentadas em seção anterior.

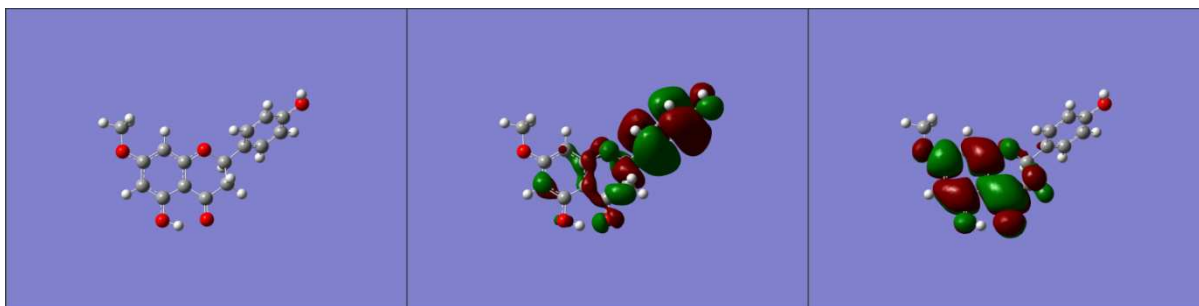


Figura 61: Geometria otimizada da sakuranetina (à esquerda) com suas respectivas densidades eletrônicas dos orbitais moleculares HOMO (meio) e LUMO (direita), onde observa-se alta redistribuição de carga. Os átomos estão representados com as cores: cinza – carbono, branco – hidrogênio e vermelho – oxigênio.

Os espectros teóricos de absorção dos elétrons de transição entre os estados fundamental e excitado obtidos da simulação são mostrados na Figura 62, onde foram comparados com os espectros de absorção dos 8 flavonóides encontrados na haste do capim dourado.

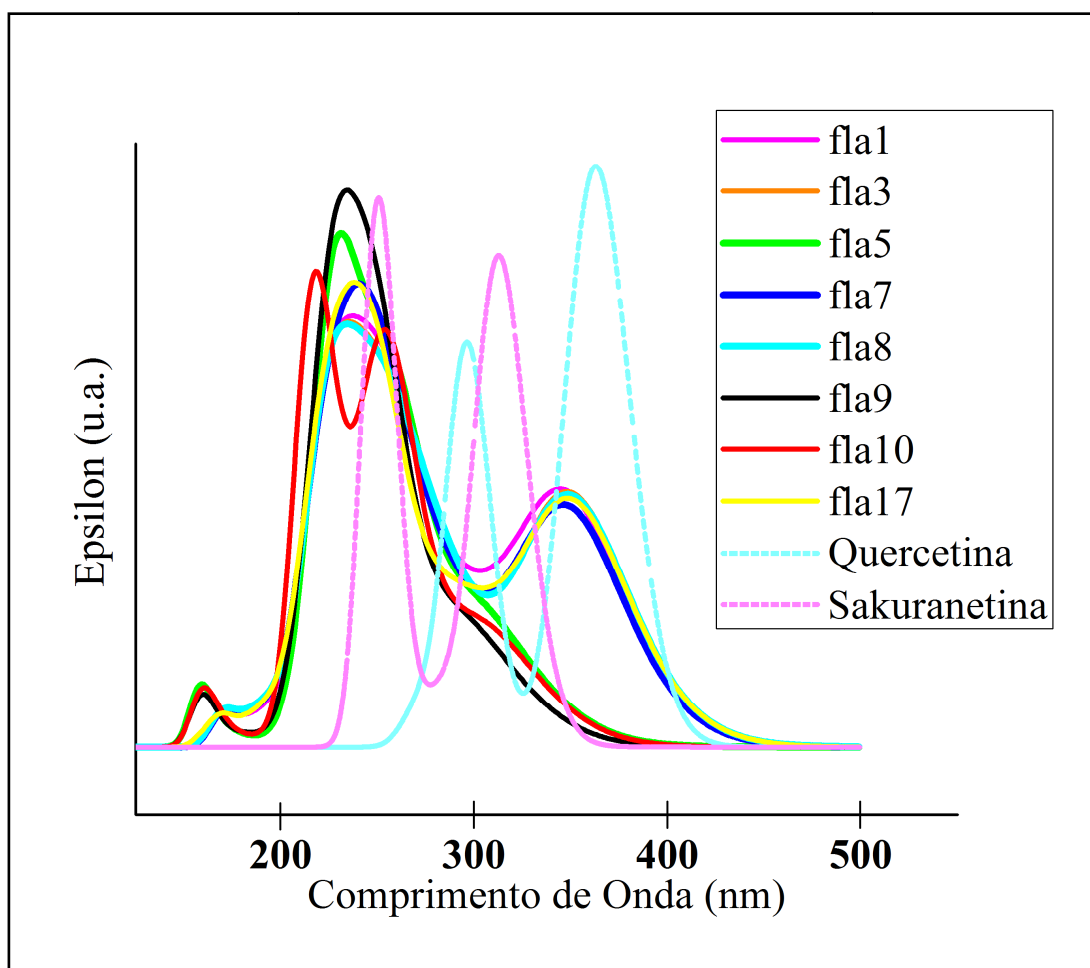


Figura 62: Os espectros de absorção calculados teoricamente para as 8 flavonóides encontrados e descritos anteriormente por Pacifico et al. e comparados com os espectros de absorção da quercetina e sakuranetina, onde o eixo y é o Coeficiente de Absortividade Molar ( $\epsilon$ ).

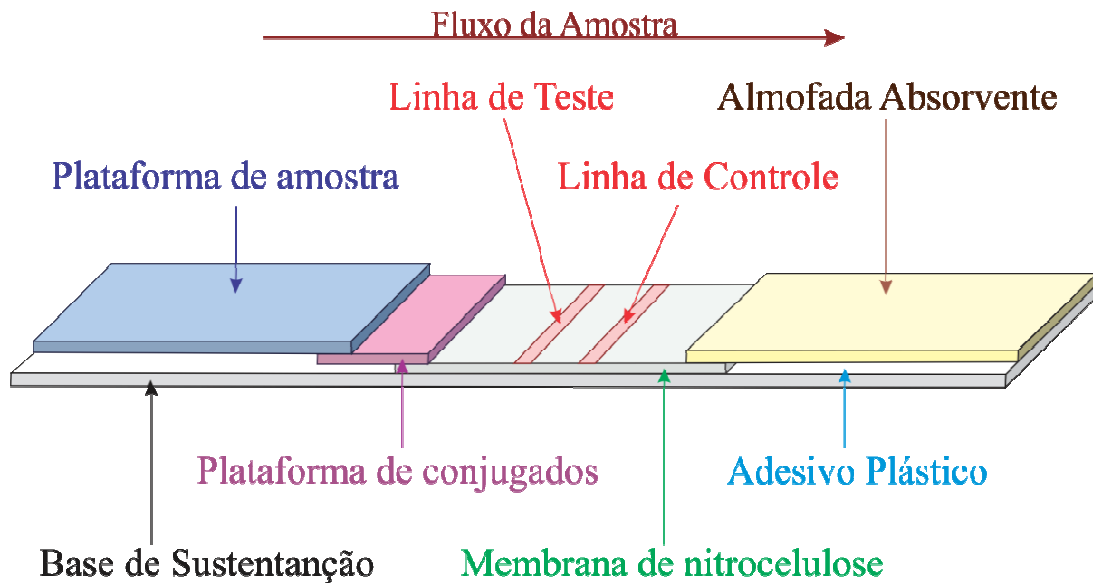
Também é notável a semelhança com os dados experimentais, os quais só diferem pelo primeiro pico de absorção da quercetina. Os outros picos possuem uma excelente concordância com a experimentação.

## **4.4 Prova de conceito do emprego dos flavonóides fluorescentes em diagnóstico por Fluxo Lateral (*Lateral Flow*)**

### **4.4.1 Introdução**

Desde o seu desenvolvimento inicial na década de 1980 [82], a tecnologia do teste por fluxo lateral ou imunoensaio por fluxo lateral (*lateral flow* ou *lateral flow immunochromatographic assay*) ganhou ampla aceitação. A principal razão para sua popularidade é a simplicidade do *design* do teste. Os dispositivos de imunoensaio por fluxo lateral são compactos e facilmente transportáveis. A maioria deles não necessita de reagente externo para os resultados, pois apenas a adição de líquido já inicia e conclui o teste [83]. Os resultados são rápidos e fáceis de serem interpretados, normalmente sem a ajuda de instrumentos para leitura, o que possibilita que o operador, seja um médico ou um paciente, simplesmente confira o resultado a olho nu. Esta tecnologia é poderosa, no sentido de que pode realizar não só um único teste, mas analitos múltiplos podem ser testados simultaneamente com um único dispositivo [83]. Ele também pode ser facilmente combinado com outras tecnologias para fornecer uma análise abrangente e segura. O processo de fabricação do teste é relativamente fácil e barato.

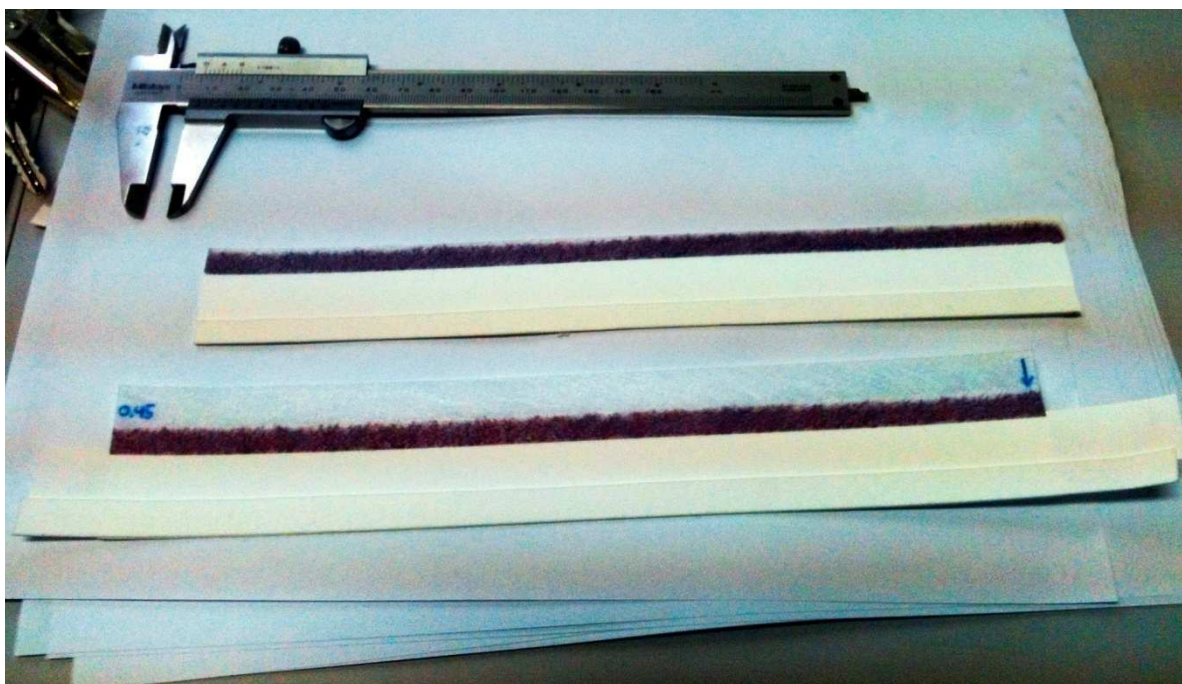
A Figura 63 mostra a configuração típica de um imunoensaio por fluxo lateral.



*Figura 63: Esquema da montagem do imunoenensaio por fluxo lateral (lateral flow).*

Tradicionalmente, o *design* dos ensaios é composto de uma variedade de materiais, cada um realiza um ou mais objetivos. As partes se sobrepõem uma sobre as outras e são montadas em um cartão suporte, que será a base de sustentação das tiras de testes, utilizando um material adesivo sensível à pressão. Este cartão suporte pode ser visto na Figura 64, o qual já possui todas as partes afixadas.



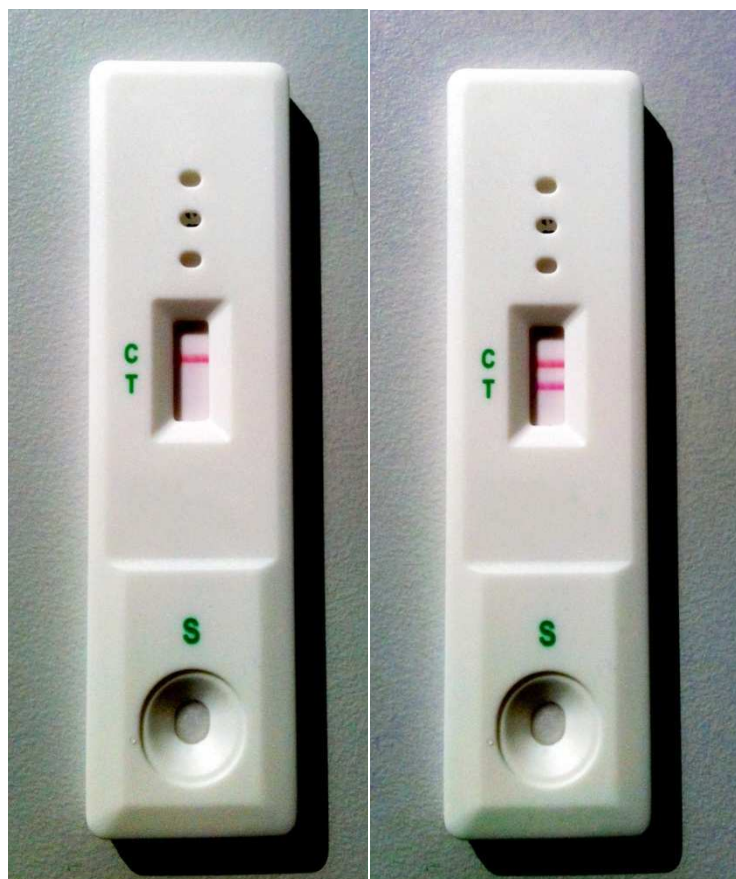


*Figura 64: Cartão suporte com a plataforma de conjugados (violeta) e a almofada absorvente (lateral oposta) sobre a membrana de nitrocelulose.*

Estes cartões são cortados em tiras menores, as quais serão colocadas dentro do dispositivo. As formas e tamanhos destas tiras variam de teste para teste e também de acordo com o fabricante.

O ensaio consiste em várias zonas, tipicamente constituídas por segmentos feitos de materiais diferentes. Quando um teste é executado, a amostra é adicionada a uma das extremidades da fita, a plataforma de amostra. Nesta etapa, a amostra é tratada para torná-la compatível com o restante do teste. A amostra tratada migra através desta região para a plataforma de conjugados, em que um conjugado de nano-partículas foi imobilizado bioquimicamente. As partículas podem ser tipicamente de ouro coloidal ou uma partícula de látex monodispersa colorida, fluorescente ou paramagnética [83]. Estas partículas foram conjugadas a um dos componentes biológicos específicos do ensaio, antígeno ou anticorpo, dependendo do ensaio a ser realizado. A amostra re-mobiliza o conjugado seco e o analito da amostra interage com o conjugado, como ambos migram para a próxima seção da faixa, que é a linha de teste (ou matriz de reação). Esta linha de teste é uma membrana porosa de nitrocelulose, o qual o outro componente biológico do ensaio foi imobilizado. Estes são tipicamente proteínas, anticorpos ou antígenos, que foram fixados em bandas em áreas específicas da membrana, as quais servem para capturar o analito e o conjugado à medida que

migram pelas linhas de captura (linha de teste e linha de controle). Os reagentes em excesso passam além das linhas de captura e são aprisionadas na almofada absorvente. Os resultados são interpretados com a presença ou ausência destas linhas de conjugado capturado a olho nu ou com auxílio de uma leitora [84]. A Figura 65 mostra dois exemplos de *lateral flow*, um negativo e outro positivo.

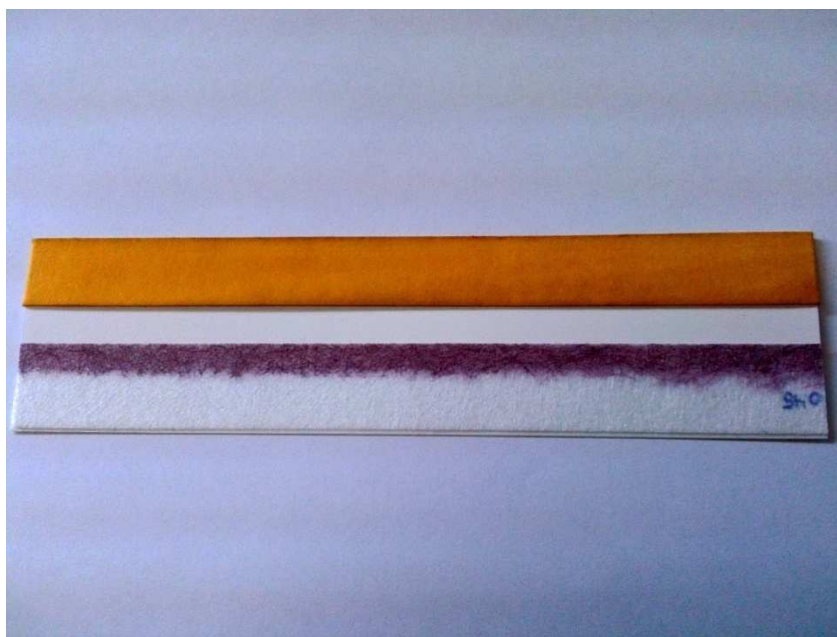


*Figura 65: Exemplo de testes por fluxo lateral (lateral flow), sendo o negativo (esquerda) e um positivo (direita). A linha de controle indica se o teste foi realizado com sucesso, independente se o resultado é negativo ou positivo para determinada doença.*

#### 4.4.2 Testes com fluoróforos naturais no *lateral flow*

Nesta seção é apresentada a prova de conceito da utilização dos flavonóides naturais estudados nesta tese.

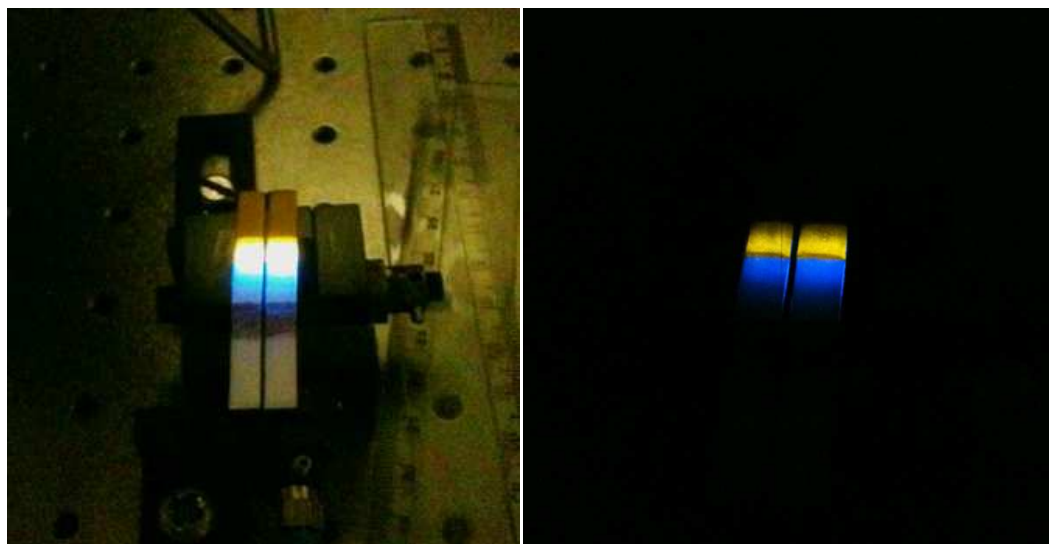
Foram realizados alguns testes simulando o teste de *lateral flow* com os flavonóides extraídos do *S. nitens*. A almofada absorvente foi impregnada com os flavonóides e colocada em sua respectiva posição em relação aos outros componentes do cartão suporte. A Figura 66 mostra o cartão confeccionado já com seus componentes.



*Figura 66: Cartão suporte com a plataforma de conjugados (violeta) e a almofada absorvente (amarela) sobre a membrana de nitrocelulose.*

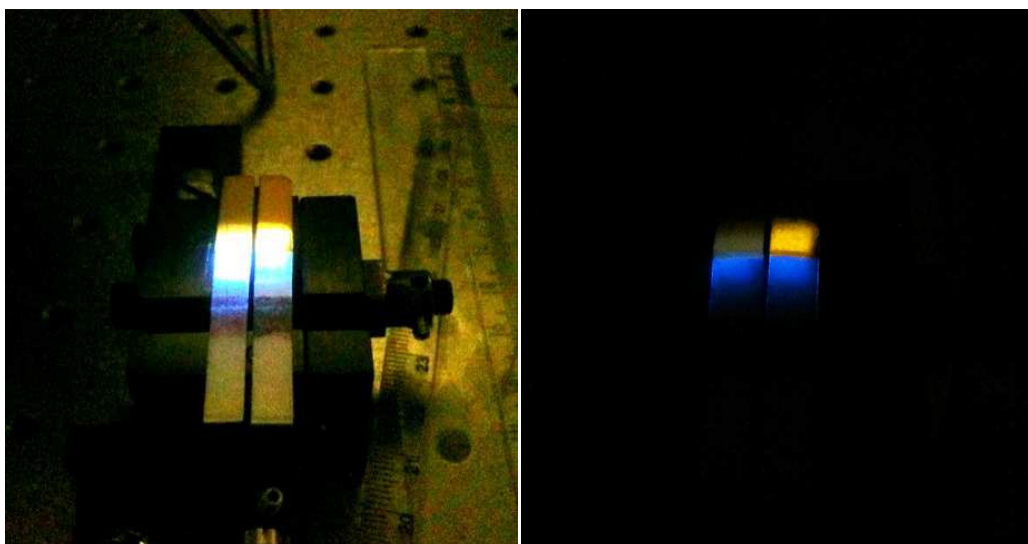
Após confeccionado o cartão, este foi cortado em tiras e essas colocadas sob o *laser* de nitrogênio para ser verificada a fluorescência da almofada absorvente (*sink pad*). Foram colocadas duas tiras uma ao lado da outra e iluminadas com o mesmo feixe de comprimento

de onda 337 nm, mostrado na Figura 67. Pode-se ver que as duas tiras brilham com mesma intensidade.



*Figura 67: Duas tiras de lateral flow iluminadas com um laser de nitrogênio de 337 nm. À esquerda uma foto sem a utilização de filtro óptico e à direita com filtro óptico, servindo apenas como atenuador de luz para a câmera fotográfica captar a região de interesse.*

Em seguida, a uma das tiras foi gotejada uma solução-tampão (*buffer*) de um teste por fluxo lateral comercial. Esta solução-tampão, nestes testes *lateral flow*, servem apenas como facilitadores de transporte fluídico, pois também é introduzido sangue (total ou apenas o plasma), fazendo as nano-partículas migrarem até o *sink pad*, o qual está impregnado de flavonóides. Assim, ao entrar em contato com estes flavonóides, as nano-partículas suprimem quase completamente a fluorescência daqueles. A solução-tampão pode ser substituída por água ou algum outro solvente que não agrida o material da qual a cartela é confeccionada, pois o teste inicia-se independente do líquido utilizado [83]. Esta supressão ocasionada devido às nano-partículas pode ser vista na Figura 68.



*Figura 68: Duas tiras de lateral flow iluminadas com um laser de nitrogênio de 337 nm. Na tira da esquerda foi gotejada a solução-tampão (buffer) para a realização do ensaio. À esquerda uma foto sem a utilização de filtro óptico e à direita com filtro óptico, onde nota-se a supressão da fluorescência na tira em que as nano-partículas entraram em contato com os flavonóides. O filtro óptico serviu apenas como atenuador de luz para a câmera fotográfica captar a região de interesse.*

Em testes do tipo *lateral flow*, em muitos casos, existe a dúvida se os componentes necessários ao ensaio, nano-partículas de ouro e proteínas, realmente migraram pela nitrocelulose. A falta desta confirmação pode induzir a resultados falso-positivos e falso-negativos. Para tanto, nossa invenção soluciona esta dúvida através da utilização de moléculas químicas fluorescentes naturais. Através da adição e combinação dessas moléculas nos testes diagnósticos podemos resolver esta questão, garantindo resultados mais confiáveis com esta utilização dos flavonóides fluorescentes adicionados ao *sinkpad*. Quando o paciente for negativo, ao final do ensaio as nano-partículas que não se ligaram às linhas de teste entrarão em contato com os flavonóides ali depositados, resultando na supressão total da fluorescência. Este resultado confirma que as nano-partículas migraram, caso contrário, quando o paciente for positivo, resultará na supressão parcial da fluorescência, permitindo quantificar o nível de ligação ocorrido no teste. Outra forma de implementarmos o teste *lateral flow* é depositando os flavonóides nas linhas teste para que funcionem como um contra-teste. Ao ser depositado na nitrocelulose em conjunto com o analito, esta fluorescerá quando não ocorrer a deposição das nano-partículas de ouro ou sofrerá *quenching* quando houver a deposição das nano-partículas, permitindo fazer duas medidas, a da fluorescência perdida e da quantidade de ouro depositada.



## 5 Considerações Finais

O copolímero fluoróforo LaPPS40 foi sintetizado e teve suas propriedades ópticas caracterizadas.

O LaPPS40 possui duas absorções principais, uma em 317 nm e outra em 445 nm, responsáveis por duas emissões no mesmo comprimento de onda 532 nm, fazendo com que seu deslocamento de Stokes seja entre 87 nm e 215 nm.

A geometria do LaPPS40 foi otimizada, a absorção óptica e as energias de HOMO e LUMO calculadas, obtendo-se valores próximos das medidas experimentalmente.

Devido sua solubilidade, o LaPPS40 não pode ser utilizado com marcador biológico, pois solventes orgânicos desnaturam proteínas [85], impossibilitando o diagnóstico.

À medida que se adiciona nano-partículas de ouro em uma solução de LaPPS40 sua fluorescência é suprimida.

Foram estudadas as propriedades óticas da *Syngonanthus nitens* no que concerne a cor e brilho dourado característicos. Não foi observado nenhum metal em seu extrato e também não há estruturas na superfície da haste.

A superfície da haste emite fluorescência em todos os comprimentos de onda.

O capim dourado conduziu os experimentos para o estudo dos flavonóides contidos em sua haste, decobrindo-se, assim, que eles fluorescem.

O extrato da haste do *S. nitens* possui absorção centrada em 350 nm e estendendo-se até 450 nm. Quando excitado em diferentes comprimentos de onda entre 225 nm e 375 nm, apresentou emissão de fluorescência em 470 nm. Seu deslocamento de Stokes é entre 95 nm e 245 nm, mostrando-se maior que o do LaPPS40.

As geometrias dos 8 flavonóides foram otimizadas e suas absorções ópticas calculadas, mostrando que a mistura desses deverá absorver luz desde 200 nm a 450 nm.

O estudo de diluição do *S. nitens* comprovou que há transferência de energia por ressonância Förster.

O acréscimo de nano-partículas de ouro de fato causa a supressão da fluorescência.

Foram estudadas as fluorescências da quercetina e sakuranetina, as quais apresentaram valores de 549 nm e 567 nm, respectivamente.

## 6 Conclusões

Conclui-se que o LaPPS40 é um forte candidato a ser introduzido no teste diagnóstico devido ao seu grande deslocamento de Stokes (o qual é responsável pela fácil obtenção dos resultados, pois, mesmo a olho nu, pode-se distinguir a luz que incide e excita da luz que retorna devido à fluorescência) e a capacidade de nano-partículas suprimirem sua fluorescência (responsável por afirmar se o indivíduo possui determinada doença ou não, pois essas nano-partículas estarão previamente ligadas às moléculas biológicas que ficarão ou não em presença do fluoróforo). Porém, do ponto de vista bioquímico, sua solubilidade o torna inadequado para tal fim, devido à desnaturação proteica causada pelo solvente orgânico.

A cor dourada do caule de *S. nitens* secas é causada pela interação da luz incidente com os vários flavonóides presentes na epiderme da superfície das hastes secas. Após a reflexão na superfície da haste lisa, uma parte substancial, principalmente na faixa de alta frequência da luz incidente, é absorvida devido à presença de flavonóides e não é refletida. Desta forma, a reflexão da luz produz um deslocamento no pico do espectro solar em direção dos comprimentos de onda mais longos. Com este estudo descobriu-se a fluorescência dos flavonóides encontrados na haste do *S. nitens*.

Conclui-se, também, que o mecanismo de fluorescência dos flavonóides de *S. nitens* é a Transferência de Energia por Ressonância Förster (FRET - *Förster Resonance Energy Transfer*), pois o comportamento da curva de eficiência de transferência de energia é o mesmo apresentado pela teoria, que a caracteriza. Quando em presença de nano-partículas, há a supressão de fluorescência, essencial para os testes diagnósticos.

Os cálculos a respeito das absorções ópticas da quercetina e sakuranetina possuem boa concordância com a experimentação. Conclui-se, também, que estes dois flavonóides podem ser utilizados nos testes de diagnósticos, pois possuem um deslocamento de Stokes razoavelmente longo, pois suas absorções ópticas mais próximas da emissão são de 374 nm e 334 nm e suas fluorescências com picos de comprimentos de onda 549 nm e 567 nm, respectivamente.

É possível concluir que os fluoróforos naturais podem ser utilizados em testes de diagnósticos. Por serem exclusivamente encontrados no Brasil, os flavonóides do capim dourado tornam a utilização destes em testes diagnósticos ainda mais viável, eles se encontram em abundância na natureza e são de fácil obtenção. Desta forma, pode-se

implementar um recurso nacional nos dispositivos já existentes e melhorar o resultado dos diagnósticos.

Assim, foram realizados com sucesso testes que apontam para um novo produto, o qual explora este método do *lateral flow*.

Outro passo a ser tomado, em trabalhos futuros, será o estudo de uma nova rota de síntese e a síntese de um novo copolímero baseado no LaPPS40, que possua características ideais (como a solubilidade em água, por exemplo).



## 7 Apêndice

### 7.1 Teoremas de Hohenberg e Kohn

O Hamiltoniano de um sistema eletrônico molecular (em unidades atômicas) na aproximação de Born-Oppenheimer, desprezando-se os efeitos relativísticos, com  $M$ -núcleos e  $N$ -elétrons, é dado por (A1):

$$\hat{H} = -\sum_{i=1}^N \frac{1}{2} \nabla_i^2 + \sum_{i=1}^N \sum_{j>1}^N \frac{1}{r_{ij}} + \sum_{A=1}^M \sum_{B>A}^M \frac{Z_A Z_B}{r_{AB}} - \sum_{A=1}^M \sum_{i=1}^N \frac{Z_A}{r_{iA}} \quad (A1)$$

Em que  $i$  e  $j$  representam elétrons,  $A$  e  $B$  representam os núcleos atômicos,  $r_i$  e  $r_A$  são as coordenadas do elétron  $i$  e do núcleo  $A$ , respectivamente, e  $Z_A$  o número atômico do átomo  $A$ . Na equação (20) o primeiro termo é o operador energia cinética, o segundo e terceiro termos são os operadores de repulsão elétron-elétron, o qual inclui a repulsão Coulombiana e todos os termos não-clássicos (troca e correlação). O quarto termo é o potencial externo relacionado aos elétrons, normalmente devido às cargas dos núcleos  $Z_A$ , dado por (A2):

$$\hat{U} = -\sum_{A=1}^M \sum_{i=1}^N \frac{Z_A}{r_{iA}} = \sum_{A=1}^M \sum_{i=1}^N -\frac{Z_A}{r_{iA}} = \sum_{i=1}^N v(r_i) \quad (A2)$$

A densidade eletrônica é definida pela equação (A3):

$$\rho(r) = \int \dots \int \Psi(r_1, r_2, \dots, r_N)^* \Psi(r_1, r_2, \dots, r_N) dr_2 dr_3 \dots dr_N \quad (A3)$$

onde  $\Psi(r_1, r_2, \dots, r_N)$  é a solução do estado fundamental do Hamiltoniano.

Então, a energia total do sistema é dada por (A4):

$$E_0 = \int \Psi(r_1, r_2, \dots, r_N)^* \hat{H}_{BO} \Psi(r_1, r_2, \dots, r_N) dr_2 dr_3 \dots dr_N = \langle \Psi | \hat{H}_{BO} | \Psi \rangle \quad (A4)$$

O potencial externo pode ser separado em um funcional trivial da densidade eletrônica. Assim, a energia total vai ser escrita como (A5):

$$E_0 = \langle \Psi | \hat{T} + \hat{V}_e | \Psi \rangle + \int \rho(r) v(r) dr \quad (A5)$$

onde

$$\hat{T} = - \sum_{i=1}^N \frac{1}{2} \nabla_i^2 \quad (A6)$$

e

$$\hat{V}_e = \sum_{i=1}^N \sum_{j>1}^N \frac{1}{r_{ij}} . \quad (A7)$$

Desta forma, fica evidenciado que o número de elétrons  $N$  e o potencial externo em que estes se movem definem completamente o sistema de muitos elétrons, ou seja, o Hamiltoniano do sistema.

A seguir, serão apresentados os dois teoremas de Hohenberg e Kohn. Estes teoremas mostram como se pode determinar o estado fundamental de um sistema com um dado potencial externo, usando-se a densidade eletrônica tridimensional como variável básica ao invés de se utilizar a função de onda de  $N$ -elétrons.

### 7.1.1 Primeiro teorema

“O primeiro teorema de Hohenberg-Kohn (HK) estabelece que o potencial externo é um funcional único de  $\rho(r)$  além de uma constante aditiva” [50].

Este teorema demonstra que o potencial externo e o número de elétrons  $N$  são determinados pela densidade eletrônica de um sistema. Desta forma, o Hamiltoniano do sistema também é determinado.

Como a energia do sistema é obtida através da resolução da equação de Schrödinger (A8),

$$\hat{H}_{BO}\Psi = E\Psi, \quad (A8)$$

a energia de um sistema eletrônico é determinada pela densidade eletrônica  $\rho(r)$ , ou seja,

$$E = E_v[\rho]. \quad (A9)$$

O índice  $v$  é colocado para explicitar a dependência com o potencial externo  $v(r)$ .

### 7.1.2 Segundo teorema

“O segundo teorema estabelece que, havendo qualquer aproximação da densidade eletrônica,  $\tilde{\rho}(r)$ , de modo que  $\tilde{\rho}(r) \geq 0$  e  $\int \tilde{\rho}(r)dr = N$ , a energia total será sempre maior ou igual a energia exata do sistema, ou seja,  $E[\tilde{\rho}] \geq E[\rho] = E_0$ ” [50].

Desta forma, é possível definir um funcional universal dado por (A10):

$$F[\rho] = \langle \Psi | \hat{T} + \hat{V}_e | \Psi \rangle, \quad (A10)$$

pois  $T$  e  $V_e$  aplicam-se universalmente a todos os sistemas eletrônicos.

É preciso observar que  $\tilde{\rho}(r)$  define seu próprio  $\tilde{v}(r)$  e, conseqüentemente, o Hamiltoniano  $\tilde{H}$  e  $\tilde{\Psi}(r_1, r_2, \dots, r_N)$ . A função  $\tilde{\Psi}(r_1, r_2, \dots, r_N)$ , por sua vez, pode ser usada como uma função tentativa para o sistema com o potencial externo  $\tilde{v}(r)$  [50].

Assim, utilizando o princípio variacional, citado na seção 2.4.4, tem-se (A11):

$$E_0 = E_v[\rho] = F[\rho] + \int \rho(r)v(r)dr \leq E_v[\tilde{\rho}] = F[\tilde{\rho}] + \int \tilde{\rho}(r)v(r)dr. \quad (A11)$$

## 7 Referências Bibliográficas e Patentes

- [1] SCHÜRGERL K., Progress in monitoring, modeling and control of bioprocesses during the last 20 years, *Journal of Biotechnology*, 85, 149-173, 2001;
- [2] HENDERSON R. K., BAKER A., MURPHY K. R., HAMBLY A., STUETZ R. M., KHAN S. J., Fluorescence as a potential monitoring tool for recycled water systems: A review, *Water Research*, 43, 863–881, 2009;
- [3] PROBER J. M., TRAINOR G. L., DAM R. J., HOBBS F. W., ROBERTSON C. W., ZAGURSKY R. J., CACUZZA A. J., JENSEN M. A., BAUMEISTER K., A System for Rapid DNA Sequencing with Fluorescent Chain-Terminating Dideoxynucleotides, *Science*, 238, 336-341, 1987;
- [4] JU J., RUAN C., FULLER C. W., GLAZER A. N., MATHIES R. A., Fluorescence energy transfer dye-labeled primers for DNA sequencing and analysis, *Proc. Natl. Acad. Sci.*, 92, 4347-4351, 1995;
- [5] PERNTHALER A., PERNTHALER J., AMANN R., Fluorescence In Situ Hybridization and Catalyzed Reporter Deposition for the Identification of Marine Bacteria, *Appl. Environ. Microbiol.*, 68, 6, 3094–3101, 2002;
- [6] FOTI L., Desenvolvimento de um Multiteste Diagnóstico para Triagem Sorológica de Doadores de Sangue na Plataforma de Microarranjos Líquidos, Tese de Doutorado, Departamento de Biologia Celular e Molecular, UFPR, Curitiba, 2012;
- [7] DANDLIKER W. B., KELLY R. J., DANDLIKER J., FARQUHAR J., LEVIN J., Fluorescence Polarization Immunoassay Theory and Experimental Method, *Immunochemistry*, 10, 219-227, 1973;
- [8] TSONGALIS G. J., SILVERMAN L. M., Molecular diagnostics: A historical perspective, *Clinica Chimica Acta*, 369, 188-192, 2006;

- [9] WONG R., TSE H., Lateral Flow Immunoassay, Springer, 2009;
- [10] YAGER P., DOMINGO G. J., GERDES J., Point-of-Care Diagnostics for Global Health, *Annu. Rev. Biomed. Eng.*, 10, 107-144, 2008;
- [11] Daw R., Finkelstein J., Lab On A Chip, *Nature*, 442, 7101, 2006;
- [12] SAIKI R. K., GELFAND D. H., STOFFEL S., SCHARF S. J., HIGUCHI R., HORN G. T., MULLIS K. B., ERLICH H. A., Primer-Directed Enzymatic Amplification of DNA with a Thermostable DNA Polymerase, *Science*, 239, 1988;
- [13] U.S. Patent No. 20020091546 A1 (2002);
- [14] YETISEN A. K., AKRAM M. S., LOWE C. R., Paper-based microfluidic point-of-care diagnostic devices, *Lab Chip*, 13, 2210, 2013;
- [15] U.S. Patent No. 6437050 B1 (2002);
- [16] U.S. Patent No. 4853335 A (1989);
- [17] WANG J., POLSKY R., XU D., Silver-Enhanced Colloidal Gold Electrochemical Stripping Detection of DNA Hybridization, *Langmuir*, 17, 5739-5741, 2001;
- [18] LOSCHENOV V. B., KONOV V. I., PROKHOROV A. M., Photodynamic Therapy and Fluorescence Diagnostics, *Laser Physics*, 10, 6, 1188-1207, 2000;
- [19] XIA X., XU Y., ZHAO X., LI Q., Lateral Flow Immunoassay Using Europium Chelate-Loaded Silica Nanoparticles as Labels, *Clinical Chemistry*, 55:1, 179-182, 2009;
- [20] BERLIM L. S., GONÇALVES H. A., de OLIVEIRA V. S., MATTOSO N., PRUDENTE A. S., BEZERRA JR A. G., SCHREINER W. H., *Syngeonanthus nitens*: Why it looks like spun gold, *Industrial Crops and Products*, 52, 597-602, 2014;

- [21] MICHALET X., PINAUD F. F., BENTOLILA L. A., TSAY J M., DOOSE S., LI J. J., SUNDARESAN G., WU A. M., GAMBHIR S. S., WEISS S., Quantum Dots for Live Cells, in Vivo Imaging, and Diagnostics, *Science*, 307, 538, 2005;
- [22] U.S. Patent No. 5486455 A (1994);
- [23] U.S. Patent No. 4435504 A (1982);
- [24] LITMAN D. J., HANLON T. M., ULLMAN E. F., Enzyme channeling immunoassay: A new homogeneous enzyme immunoassay Technique, *Anal. Biochem.*, 106, 223-229, 1980;
- [25] WORKMAN S., WELLS S. K., PAU C-P., OWEN S. M., DONG X. F., LABORDE R., GRANADE T. C., Rapid detection of HIV-1 p24 antigen using magnetic immuno-chromatography (MICT), *Journal of Virological Methods*, 160, 14-21, 2009;
- [26] JAIN K. K., Nanodiagnostics: application of nanotechnology in molecular diagnostics, *Informa Healthcare*, 3, 2, 153-161, 2003;
- [27] SCHNEIDER L. B., Desenvolvimento de um Chip Microfluídico para Diagnósticos em Saúde Pública: Prova de Conceito, Dissertação Mestrado, Departamento de Física, UFPR, Curitiba, 2010;
- [28] SUZUKI A., Cross-Coupling Reactions Of Organoboranes: An Easy Way To Construct C-C Bonds (Nobel Lecture), *Angew. Chem. Int.*, 50, 6723 – 6737, 2011;
- [29] PACIFICO M., NAPOLITANO A., MASULLO M., HILARIO F., VILEGAS W., PIACENTE S., DOS SANTOS L. C., Metabolite fingerprint of “capim dourado” (*Syngonanthus nitens*), a basis of Brazilian handicrafts. *Industrial Crops and Products* 33, 488–496, 2011;
- [30] LEE C., YANG W., PARR R. G., Density-functional crystal orbital study on the structures and energetics of polyacetylene isomers, *Phys. Rev. B*, 37, 785–789, 1988;

- [31] ATKINS P., FRIEDMAN, R., Molecular Quantum Mechanics, 4ed. Oxford University Press, Oxford, Great Britain, 2008;
- [32] LAKOWICZ J. R. Principles of Fluorescence Spectroscopy. 2ed. Plenum Publishers, 1999;
- [33] TURCHETTI D. A, Síntese, Caracterização e Propriedades Eletro-ópticas de Polímeros Conjugados Contendo Fluoreno e Bipiridina e seu Complexo com Európio, Dissertação Mestrado, Departamento de Química, UFPR, Curitiba, 2011;
- [34] PAVIA D. L., LAMPMAN G. M., KRIZ G. S, Introduction to Spectroscopy, Brooks/Cole – Thompson Learning, 3ed, 2001;
- [35] VALEUR B., Molecular Fluorescence Principles and Application, Wiley VCH, 2001;
- [36] ATKINS P., PAULA J., Atkins – Físico-química., 7ed., LCT, 2003;
- [37] AKCELRUD L., Electroluminescent Polymers, Prog. Polym. Sci., 28, pp. 875-962, 2003;
- [38] BURROWS H., WEIR R., STOHNER J., Pure and Applied Chemistry - The Scientific Journal of IUPAC, Vol. 86, Ed. 6, 2014;
- [39] DEXTER D. L. A theory of sensitized luminescence in solids, The Journal of Chemical Physics, 21, p. 836, 1953;
- [40] FÖRSTER T., Zwischenmolekulare Energiewanderung und Fluoreszenz, Annalen Der Physik, 6, 2, 1948;
- [41] SZABO A., OSTLUND N. S., Modern Quantum Chemistry – Introduction to Advanced Electronic Structure Theory, Dover Publications, Mineola, NY, 1996;
- [42] LEVINE I. N, Quantum Chemistry, 5ed. Pearson Education, Brooklyn, NY, 2006;

[43] FORESMAN J. B., FRISCH  $\text{\AA}$ ., Exploring Chemistry with Electronic Structure Methods, 2ed. Gaussian, Inc., Pittsburgh, PA, 1996;

[44] FRISCH M. J., TRUCKS G. W., SCHLEGEL H. B., SCUSERIA G. E., ROBB M. A., CHEESEMAN J. R., SCALMANI G., BARONE V., MENNUCCI B., PETERSSON G. A., NAKATSUJI H., CARICATO M., Li X., HRATCHIAN H. P., IZMAYLOV A. F., BLOINO J., ZHENG G., SONNENBERG J. L., HADA M., EHARA M., TOYOTA K., FUKUDA R., HASEGAWA J., ISHIDA M., NAKAJIMA T., HONDA Y., KITAO O., NAKAI H., VREVEN T., MONTGOMERY J. A., Jr., PERALTA J. E., OGLIARO F., BEARPARK M., HEYD J. J., BROTHERS E., KUDIN K. N., STAROVEROV V. N., KOBAYASHI R., NORMAND J., RAGHAVACHARI K., RENDELL A., BURANT J. C., IYENGAR S. S., TOMASI J., COSSI M., REGA N., MILLAM J. M., KLENE M., KNOX J. E., CROSS J. B., BAKKEN V., ADAMO C., JARAMILLO J., GOMPERTS R., STRATMANN R. E., YAZYEV O., AUSTIN A. J., CAMMI R., POMELLI C., OCHTERSKI J. W., MARTIN R. L., MOROKUMA K., ZAKRZEWSKI V. G., VOTH G. A., SALVADOR P., DANNENBERG J. J., DAPPRICH S., DANIELS A. D., FARKAS Ö., FORESMAN J. B., ORTIZ J. V., CIOSLOWSKI J., FOX D. J., Gaussian 09, Revision B.01, Gaussian, Inc.: Wallingford, CT, 2009;

[45] HARTREE D. R., The wave mechanics of an atom with a non-coulomb central field. Proc. Cambridge Phil. Soc, 24, 89, 1928;

[46] FOCK V., Näherungsmethode zur Lösung des quantenmechanischen Mehrkörperproblems, Zeitschrift für Physik, 61, 126-148, 1930;

[47] SLATER J. C., The theory of complex spectra. The Physical Review, 34, 1293, 1929;

[48] KOHN W., BECKE A. D., PARR R. G., Density Functional Theory of Electronic Structure, J. Phys. Chem., 100, 12974-12980, 1996;

[49] SCHNEIDER C. B., Estudo das propriedades fotofísicas de um copolímero com blocos fluoreno-vinileno-fenileno e fluoreno-benzotiadiazol, Dissertação de Mestrado, Departamento de Engenharia e Ciência dos Materiais – PIPE, UFPR, Curitiba, 2014;



- [50] MORGON N. H., COUTINHO, K., Métodos de Química Teórica e Modelagem Molecular, Editora Livraria da Física, São Paulo, 2007;
- [51] ZIEGLER T., Approximate density functional theory as a practical tool in molecular energetics and dynamics, Chemical Reviews, 91, 651, 1991;
- [52] HOHENBERG P., KOHN W., Inhomogeneous electron gas, Physical Review B, 136, 1964;
- [53] van LEEUWEN R., Kohn-Sham potentials in density functional theory, Academisch Proefschrift, Vrije Universiteit Amsterdam, Amsterdam, N-H, Nederland, 1994;
- [54] KOHN W., SHAM L. J., Self-consistent equations including exchange and correlation effects, Physical Review A, 140, 1133, 1965;
- [55] RODRIGUES P. C., BERLIM L. S., AZEVEDO D., SAAVEDRA N. C., PRASAD P. N., SCHREINER W. H., ATVARIS T. D. Z., AKCELRUD L., Electronic Structure and Optical Properties of an Alternated Fluorene–Benzothiadiazole Copolymer: Interplay between Experimental and Theoretical Data, The Journal of Physical Chemistry, 116, 3681–3690, 2012;
- [56] BEAMSON G., BRIGGS D., High Resolution XPS of Organic Polymers: the Scienta ESCA300 Database, John Wiley & Sons, England, 1992;
- [57] LIN B. C., CHENG C. P., LAO Z. P. M., Reorganization energies in the transports of holes and electrons in organic amines in organic electroluminescence studied by density functional theory, J. Phys. Chem. A, 107, 5241–5251, 2003;
- [58] STEPHENS P. J., DEVLIN F. J., CHABALOWSKI, C. F., FRISCH M. J., Ab initio calculation of vibrational absorption and circular dichroism spectra using density functional force fields, J. Phys. Chem., 98, 11623–11627, 1994;

- [59] KIM N. T., ROSENZWEIG Z., Development of an Aggregation-Based Immunoassay for Anti-Protein A Using Gold Nanoparticles, *Anal. Chem.*, 74, 1624-1628, 2002;
- [60] HIRSCH L. R., JACKSON J. B., LEE A., HALAS N. J., WEST J. L., A Whole Blood Immunoassay Using Gold Nanoshells, *Anal. Chem.*, 75, 2377-2381, 2003,
- [61] PAROLO C., de la ESCOSURA-MUÑIZ A., MERKOÇI A., Enhanced lateral flow immunoassay using gold nanoparticles loaded with enzymes, *Biosensors and Bioelectronics*, 40, 412-416, 2013;
- [62] GUPTA S., HUDA S., KILPATRICK P. K., VELEV O. D., Characterization and Optimization of Gold Nanoparticle-Based Silver-Enhanced Immunoassays, *Anal. Chem.*, 79, 3810-3820, 2007;
- [63] POSTHUMA-TRUMPLE G. A., KORF J., van AMERONGEN A., Lateral flow (immuno)assay: its strengths, weaknesses, opportunities and threats. A literature survey, *Anal Bioanal Chem*, 393, 569–582, 2009;
- [64] SCHMIDT I. B., FIGUEIREDO I. B., SCARIOT A., Ethnobotany and effects of harvesting on the population ecology of *Syngonanthus nitens* (Bong.) Ruhland (Eriocaulaceae), a non-timber forest product from Jalapão region, central Brazil. *Econ. Bot.* 61, 73–85, 2007;
- [65] SIQUEIRA, G., ABDILLAHI, H., BRAS, J., DUFRESNE, A., High reinforcing capability cellulose nanocrystals extracted from *Syngonanthus nitens* (Capim Dourado), *Cellulose*, 17, 289–298, 2010;
- [66] SATYANARAYANA, K.G., GUIMARAES, J.L., WYPYCH, F., Studies on lignocellulosic fibers of Brazil. Part I: Source, production, morphology, properties and applications, *Composites A: Appl. Sci. Manufact.*, 38, 1694–1709, 2007;
- [67] SCATENA V. L., VICH D. V., PARRA L. R., Anatomia de escapos, folhas e brácteas de *Sygonanthus sect. Eulapis* (Bong. ex Koern.) Ruhland (*Eriocaulaceae*), *Acta Bot. Bras.* 18, 825-837, 2004;

- [68] JAVELLE M., VERNOUD V., ROGOWSKY V. P. M., INGRAM G. C., Epidermis: the formation and functions of a fundamental plant tissue. *New Phytologist* 189, 17-39, 2004;
- [69] JACKSON J. D., Classical Electrodynamics, Third Ed. J. Wiley & Sons, Hoboken, N.J., 1998;
- [70] TAKATA Y., TAMASAKU K., TOKUSHIMA T., MIWA D., SHIN S., ISHIKAWA T., A probe of intrinsic valence band electronic structure: Hard x-ray photoemission. *Appl. Phys. Lett.* 84, 4310- 4312, 2004;
- [71] VIGNERON J. P., RASSART M., VÉRTESY Z., KERTÉSZ K., SARRAZIN M., BIRÓ L. P., ERTZ D., LOUSSE V., Optical properties and function of the white filamentary hair covering the edelweiss bracts, *Phys. Rev. E* 71, 011906-8 Vigneron J. P., Simonis P., 2012. Natural photonic crystals. *Physica B* 407, 4032-4036, 2005;
- [72] SHARMA V., CRNE M., PARK J. O., SHRINIVASARAO M., Structural origin of circularly polarized iridescence in jeweled beetles. *Science* 325, 449-451, 2009;
- [73] SEAGO A. E., BRADY P., VIGNERON J. P., SCHULTZ T. D., Gold bugs and beyond: a review of iridescence and structural color mechanisms in beetles (*Coleoptera*). *J. R. Soc. Interface* 6, S165-S184, 2009;
- [74] SISA M., BONNET S. L., FERREIRA D., Van der WAESTHUIZEN J. H., Photochemistry of Flavonoids, *Molecules*, 15, 5196-5245, 2010;
- [75] WANG F., TAN W. B., ZHANG Y., FAN X., WANG M., Luminescent nanomaterials fo biological labelling, *Nanotechnology*, 17, R1-R13, 2006;
- [76] FORMICA J. V., REGELSON W., Review of the Biology of Quercetin and Related Bioflavonoids, *Fd Chem. Toxic*, 33, 12, 1061-1080, 1995;
- [77] RAUHA J., The search for biological activity in Finnish plant extracts containing phenolic compounds, Academic Dissertation, University of Helsinki, Helsinki, Finland, 2001;

- [78] ATKINSON P., BLAKEMAN J. P., Seasonal occurrence of an antimicrobial flavanone, sakuranetin, associated with glands on leaves of *Ribes nigrum*, *New Phytol.*, 92, 63-74, 1982;
- [79] TAKEMOTO J. K., REMSBERG C. M., YÁÑEZ J. A., Vega-Villa K. R., Davies N. M., Stereospecific analysis of sakuranetin by high-performance liquid chromatography: Pharmacokinetic and botanical applications, *Journal of Chromatography B*, 875, 136–141, 2008;
- [80] HARBORNE, J.B., MABRY, T.J., MABRY, H., *The Flavonoids*, London, Chapman & Hall, 1975;
- [81] ANDERSEN Ø. M., MARKHAM K. R., *Flavonoids - Chemistry, Biochemistry and Applications*, Taylor & Francis Group, CRC Press, USA, 2006;
- [82] U.S. Patent No. 6,485,982 (1988);
- [83] WONG R. C., TSE H. Y., *Lateral Flow Immunoassay*, Springer, USA, 2009;
- [84] YETISEN A. K., Paper-based microfluidic point-of-care diagnostic devices, *Lab on a Chip*, 13, 12, 2210–2251, 2013;
- [85] KHMELNITSKY Y. L., MOZHAEV V. V., BELOVA A. B., SERGEEVA M. V., MARTINEK K., Denaturation capacity: a new quantitative criterion for selection of organic solvents as reaction media in biocatalysis, *Eur. J. Biochem.*, 198, 31-41, 1991.

## **8 ANEXOS**

Segue a produção científica relacionada à presente tese.

# Electronic Structure and Optical Properties of an Alternated Fluorene–Benzothiadiazole Copolymer: Interplay between Experimental and Theoretical Data

Paula C. Rodrigues,<sup>†,‡</sup> Leonardo S. Berlim,<sup>§,‡</sup> Diego Azevedo,<sup>#,‡</sup> Nestor C. Saavedra,<sup>||</sup> Paras N. Prasad,<sup>⊥</sup> Wido H. Schreiner,<sup>§</sup> Teresa D. Z. Atvars,<sup>#</sup> and Leni Akcelrud<sup>\*,†</sup>

<sup>†</sup>Paulo Scarpa Polymer Laboratory, Federal University of Parana (LaPPS), CP 19081, CEP 81531-980, Curitiba, Paraná, Brazil

<sup>§</sup>Laboratory of Surfaces and Interfaces, Federal University of Parana (LSI), CP 19081, CEP 81531-980, Curitiba, Paraná, Brazil

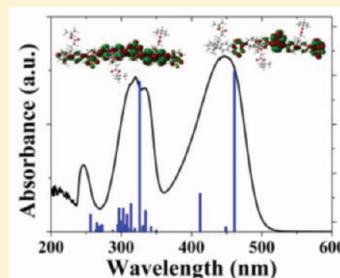
<sup>||</sup>Physics Department, Federal Technological University of Parana, Av. Sete de Setembro, 3165, CEP 80230-901, Curitiba, Paraná, Brazil

<sup>⊥</sup>Institute for Lasers, Photonics and Biophotonics (ILPB)—University at Buffalo, State University of New York, 458 Natural Sciences Complex-North Campus, Buffalo, New York 14260, United States

<sup>#</sup>Institute of Chemistry, State University of Campinas (UNICAMP), P.O. Box 6154, Campinas, SP, CEP 13084-971, Brazil

## S Supporting Information

**ABSTRACT:** The donor–acceptor copolymer containing benzothiadiazole (electron acceptor), linked to functionalized fluorene (electron donor), [poly[9,9-bis(3'-(*tert*-butyl propanoate))fluorene-*co*-4,7-(2,1,3-benzothiadiazole)] (LaPPS40), was synthesized through the Suzuki route. The polymer was characterized by scanning electron microscopy, gel permeation chromatography, NMR, thermal analysis, cyclic voltammetry, X-ray photoelectron spectroscopy, UV–vis spectrometry, and photophysical measurements. Theoretical calculations (density functional theory and semiempirical methodologies) used to simulate the geometry of some oligomers and the dipole moments of molecular orbitals involved were in excellent agreement with experimental results. Using such data, the higher energy absorption band was attributed to the  $\pi$ – $\pi^*$  ( $S_0 \rightarrow S_4$ ) transition of the fluorene units and the lower lying band was attributed to the intramolecular (ICT) ( $S_0 \rightarrow S_1$ ) charge transfer between acceptor (benzothiadiazole) and donor groups (fluorene) (D–A structure). The ICT character of this band was confirmed by its solvatochromic properties using solvents with different dielectric properties, and this behavior could be well described by the Lippert–Mataga equation. To explain the solvatochromic behavior, both the magnitude and orientation of the dipole moments in the electronic ground state and in the excited state were analyzed using the theoretical data. According to these data, the change in magnitude of the dipole moments was very small for both transitions but the spatial orientation changed remarkably for the lower energy band ascribed to the ICT band.



## 1. INTRODUCTION

In the steadily growing field of polymer solar cells several types of polymer systems and device architectures have emerged as attractive means to improve the performance and chemical stability of the devices.<sup>1</sup> There are two main approaches to achieve this goal: one is the blending of polymer materials to obtain new properties or to combine the characteristics of the parent components, producing devices with enhanced performance. The other involves developing new materials, in general copolymers, with better properties for specific applications.<sup>1–3</sup> In this last category, molecular engineering of conjugated polymers should be performed aiming the reduction of the band gap and at the same time modulating HOMO and LUMO energy levels to optimal values, both fundamental requirements for solar cells applications.<sup>4</sup> Under this perspective, it is practically impossible to achieve these properties using a polymer with only one repeating unit, and copolymers represent an alternative in this line of pursuit. One particular

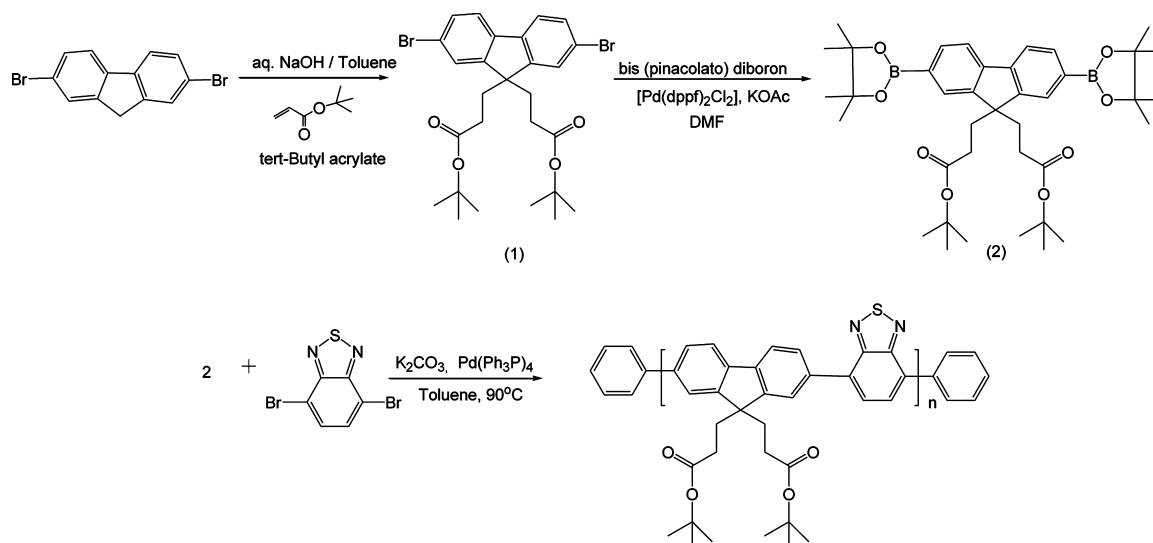
type of promising structure that has been explored with success is characterized by the presence of groups with different electron affinities forming a type of donor–acceptor (D–A) system which may favor charge separation processes.<sup>5</sup> Since at least two comonomers must be used in this type of copolymers, their electronic absorption bands may cover a wider range of the visible spectrum, enhancing the ability to absorb solar light, making them better light collectors than polymers with only one chromophore. The interaction between an electron acceptor with a donor<sup>6</sup> facilitates photoinduced charge separation in photovoltaic devices. Moreover, the D–A structure allows the desired tuning of the energy levels, with systematic variation in the polymer electronic structure. The origin of the well-separated dual-absorption band sometimes

Received: November 16, 2011

Revised: February 27, 2012

Published: March 8, 2012





**Figure 1.** Chemical route for synthesis of poly[9,9-bis(3'-(*tert*-butyl propanoate))fluorene-co-4,7-(2,1,3-benzothiadiazole)] (LaPPS40).

encountered in semiconducting polymers using the “donor–acceptor” concept has been reviewed,<sup>5</sup> and the present contribution aims to add further insight to this important subject by describing the correlations found between structure and optical properties of the D–A copolymer, taking into account theoretical and experimental data.

The D–A character of a chemical structure can be studied by theoretical and experimental methodologies. From the experimental point of view, one possible methodology is the photoluminescence technique, where the D–A molecule can depict solvatochromic properties in solvents with different polarities. The larger the changes of the dipole moments by photoexcitation, the higher the spectral changes will be either in terms of band profile or in terms of peak positions. For several systems these solvatochromic properties can be well represented by the Lippert–Mataga equation,<sup>7,8</sup> which associates the spectral changes with modification of the dipole moments of both the electronic ground state and the electronic excited state. Although these changes can be experimentally determined, the individual dipole moments of each component or their spatial orientation cannot be obtained with this data set. There are several methodologies for theoretical studies of chemical compounds attempting to describe their optical properties.<sup>9,10</sup> In general, quantum mechanical calculations may be used for complex and larger systems with the use of adequate methodology, taking into account that often the optical properties of polymers can be simulated using oligomers. Here the theoretical study was performed by computational quantum mechanical calculations initially using the density functional theory (DFT) method<sup>11</sup> to optimize the geometry of a single repeating unit. Having the optimized geometry of this structure, using semiempirical quantum mechanical calculations, the geometry of oligomers was also optimized. The extent of the D–A character was probed by analyzing the changes of dipole moments in both the electronic ground and the excited states, which were further correlated with the experimental data of optical properties in different solvents.

To attain a significant increase in the intramolecular charge transfer band, adequate combination of donor and acceptor groups is crucial.<sup>12</sup> Examples of electron-accepting species include quinoline, 2,1,3-benzothiadiazole, thiazole, 1,3,4-

thiadiazole, pyridazine, and 1,3,5-triazine as electron-accepting species,<sup>3,13–15</sup> whereas heteroaromatic rings such as thiophene and pyrrole, along with other units like fluorene,<sup>16</sup> carbazole,<sup>17</sup> 4*H*-cyclopenta[2,1-*b*:3,4-*b'*]dithiophene (CPDT), and dithieno[3,2-*b*:2',3'-*d*]silole (DTS)<sup>18</sup> polymers have been explored as donor species. The D–A strategy has afforded results in PCEs reaching the 4–7% range.<sup>19–21</sup>

In this work two classical units in D–A copolymer architecture were used to get insights related to the changes of dipole moments by photoexcitation and for describing the D–A character of the electronic transitions: the fluorene moiety as donor and benzothiadiazole as acceptor units, composing the alternated poly[9,9-bis(3'-(*tert*-butyl propanoate))fluorene-co-4,7-(2,1,3-benzothiadiazole)] (LaPPS40). Insertion of functional groups in the side chains of polyfluorene aimed to facilitate processing and expand applications of the material. The (*tert*-butyl propanoate) branches can easily be converted to carboxyl groups, rendering the polymer especially suitable for interaction with the titanium oxide in dye-type solar cells. This kind of modification has been addressed in similar cases, as, for example, fabrication of anionic polyfluorene focusing on its use in optoelectronic devices as LEDs<sup>22</sup> as well as in biochemical sensors.<sup>23,24</sup> The changes of the optical properties were studied using both the experimental approach determining some photophysical properties of the copolymer and theoretical methodologies to support the experimental data.

## 2. EXPERIMENTAL SECTION

**Materials.** The chemicals used were all purchased from Aldrich and used as received, without further purification, unless when described in the specific chemical procedure. Solvents (chloroform, toluene, *N*-methyl pyrrolidone (NMP), and *o*-dichlorobenzene (*o*-DCB)) were from Aldrich, HPLC grade and used as received. Tetrahydrofuran (THF) (Aldrich, HPLC) was purified by distillation.

**Chemical Procedures.** Poly [9,9-bis(3'-(*tert*-butylpropanoate))fluorene-co-4,7-(2,1,3-benzothiadiazole)] (LaPPS40) was synthesized by the Suzuki route (Figure 1) as described elsewhere.<sup>25</sup>

**2,7-Dibromo-9,9-bis(3-(*tert*-butyl propanoate))fluorene (1).** To a two-necked round-bottom flask, 2,7-dibromofluorene

(3.03 g, 12.4 mmol), tetrabutylammonium bromide (105 mg, 0.33 mmol), and 20 mL of toluene were added under Ar atmosphere. After 15 min, a solution of 50 wt % aqueous NaOH was added dropwise and the solution was stirred for 20 min. After that, *tert*-butyl acrylate (6.56 g, 51.2 mmol) was added dropwise and the mixture was stirred at 25 °C overnight. After this time, the reaction product was extracted with dichloromethane, washed three times with water and saturated NaCl aqueous solution, and dried with anhydrous MgSO<sub>4</sub>. After solvent removal the product was purified in a chromatographic column to give a white solid (**1**) with a 75% yield.

<sup>1</sup>H NMR (CDCl<sub>3</sub>, δ): 7.54–7.48 (m, 6H); 2.30 (t, 4H), 1.47 (t, 4H), 1.30 (s, 18H). <sup>13</sup>C NMR (CDCl<sub>3</sub>, δ): 172.22; 149.96; 139.09; 131.06; 126.48; 122.07; 121.45; 80.48; 54.07; 34.41; 29.85; 28.02. Anal. Calcd for C<sub>27</sub>H<sub>32</sub>Br<sub>2</sub>O<sub>4</sub>: C, 55.88; H, 5.56. Found: C, 55.67; H, 5.45.

**2-(4,4,5,5-Tetramethyl-1,3,2-dioxaborolan-2-yl)-9,9-bis(3-(*tert*-butyl propanoate))fluorene (2).** A mixture containing 3.27 g (6.5 mmol) of **1**, 2.7 g (27.5 mmol) of KOAc, and 4.2 g (16.5 mmol) of bis(pinacolato)diboron in 40 mL of dry DMF was placed in a flask. After stirring for 20 min under Ar atmosphere, 150 mg of [1,1'-bis(diphenylphosphine)ferrocene] dichloropalladium(II) was added quickly. The mixture was stirred overnight at a temperature of 90 °C. After this period, the mixture was cooled, placed in water, and extracted with dichloromethane. The organic phase was washed with water and dried with MgSO<sub>4</sub>. After removing the solvent, the residue was purified with column chromatography, yielding compound **3** as a white solid (yield 57%).

<sup>1</sup>H NMR (CDCl<sub>3</sub>, δ): 7.80–7.72 (m, 6H); 2.38 (t, 4H), 1.42–1.39 (m, 28H), 1.30 (s, 18H). <sup>13</sup>C NMR (CDCl<sub>3</sub>, δ): 172.88; 147.89; 143.83; 134.36; 129.03; 128.40; 119.69; 83.92; 79.97; 53.54; 34.48; 29.99; 28.04; 24.96. Anal. Calcd for C<sub>39</sub>H<sub>56</sub>B<sub>2</sub>O<sub>8</sub>: C, 69.45; H, 8.37. Found: C, 67.78; H, 8.78.

**Poly[9,9-bis(3'-(*tert*-butyl propanoate))fluorene-co-4,7-(2,1,3-benzothiadiazole)]-LaPPS40.** To a 25 mL flask 210 mg (0.31 mmol) of 4,7-dibromo-2,1,3-benzothiadiazole, 91 mg (0.31 mmol) of **2**, 8 mg of Pd (Ph<sub>3</sub>P)<sub>4</sub>, and 515 mg (3.7 mmol) of potassium carbonate were added. Then a mixture of water and toluene was added to the flask and Ar was bubbled into the system for 20 min. The mixture was heated to 90 °C for 24 h under Ar and after this period precipitated in methanol. Then the polymer was filtered and washed with methanol and acetone. Purification was performed by Soxhlet extraction, yielding a fibrous yellow solid (yield 57%).

<sup>1</sup>H NMR (CDCl<sub>3</sub>, δ): 8.18–7.98 (br, 8H); 2.55 (br, 4H); 1.79 (m, 4H); 1.33 (s, 18H). <sup>13</sup>C NMR (CDCl<sub>3</sub>, δ): 172.90; 154.25; 149.22; 140.96; 137.04; 133.35; 128.22; 129.27; 124.04; 120.38; 80.18; 54.03; 34.68; 30.32; 28.08. IR:  $\bar{\nu}_{(\text{C=O})\text{ester}}$  1728 cm<sup>-1</sup>;  $\bar{\nu}_{(\text{C-O})\text{ester}}$  1149 cm<sup>-1</sup>. Anal. Calcd for C<sub>33</sub>H<sub>36</sub>N<sub>2</sub>O<sub>4</sub>S: C, 71.19; H, 6.52; N, 5.03; S, 5.76. Found: C, 67.98; H, 5.92; N, 5.48; S, 4.26.

**Equipment.** The molar mass measurements were performed with a Waters 2690 gel permeation chromatograph, equipped with a Waters 996 refractive index photodiode detector. The calibration curve was built with polystyrene standards and tetrahydrofuran (THF) as eluant at a flow rate of 1.0 mL/min at 30 °C.

<sup>1</sup>H and <sup>13</sup>C NMR spectra were recorded in chloroform on a Bruker system operating at 400 MHz at room temperature.

Samples for FTIR measurements were cast onto polished silicon disks. Spectra were run in a Nicolet Magna-TR 560 infrared spectrophotometer.

Elemental analysis (Eager 200 model, C, H, N, S) was carried out to determine the composition of the precursors and LaPPS40 copolymer.

The thermal decomposition temperature of the prepared polymer was determined by a Netzsch Analyzer TG 209. For the thermogravimetric tests (TGA) a heating rate of 20 °C/min was used with a nitrogen flow of 15 mL/min from room temperature to 450 °C. The DSC equipment used was a Netzsch DSC 204 F1. All samples were heated from 20 to 250 °C at a rate of 10 °C/min in nitrogen atmosphere and then cooled to 20 at 10 °C/min. This procedure was repeated, and the second run was recorded.

UV–vis spectra were taken in a Shimadzu spectrophotometer model NIR 3101. Steady-state fluorescence spectroscopy was performed in Shimadzu spectrophotometer model RF5301-PC, using a square cuvette of 1 cm for solutions. The spectral range was from 250 to 500 nm for the excitation spectra and from 300 to 650 nm for emission spectra ( $\lambda_{\text{exc}} = 445$  nm). Time-resolved emission was performed using a F900 (Edinburg Analytical Instruments) instrument using a single-photon counting technique, using pulsed diode lasers ( $\lambda_{\text{exc}} = 375$  and 470 nm) and a MCP-PMT as a detector. Decays were recorded in the emission spectral range from 500 to 600 nm. Data treatment was done using exponential functions by the software provided by Edinburg Instruments

$$F(t) = \sum_{i=1}^N B_i \exp\left(-\frac{t}{\tau_i}\right) \quad (1)$$

where  $B_i$  is a pre-exponential factor representing the fractional contribution to the time-resolved decay of the component with a lifetime  $\tau_i$  and  $t$  is the time. Samples were saturated with N<sub>2</sub>. Ludox was used as scatterer to register the instrumental response. Deconvolution of the laser pulse was performed, optimizing the random residual distribution to achieve a  $\chi^2$  parameter close to unity.<sup>26,27</sup> Decays were initially recorded using pulsed diode lasers for excitation (375 and 470 nm) and collected with emission at 550 nm. Experiments of time-resolved emission spectroscopy were performed using the same excitations and tuning the emission from 500 to 700 nm in intervals of 10 nm.

A potentiostat/galvanostat PAR 273A was used for electrochemical characterization with a three-electrode cell: working electrode (Pt), reference electrode (Ag/Ag<sup>+</sup> in acetonitrile), counter electrode (Pt), supporting electrolyte (0.1 mol L<sup>-1</sup> tetrabutylammonium hexafluorophosphate in acetonitrile), and scanning rate 50 mV/s. The ferrocenium/ferrocene pair was used as internal standard.

Scanning electron microscopy was done with a Phenom FEI desktop instrument operating at 5 kV. The LaPPS40 film sample was coated with a sputtered gold film, and images were obtained by backscattered electrons.

XPS spectra were collected on a VG Microtech ESCA3000 system using Al K $\alpha$  X-rays. The system has a 250 mm semihemispherical analyzer with 9 channeltron detectors. The ultimate vacuum of the machine is  $3 \times 10^{-10}$  mbar, and the overall resolution is 0.8 eV. Survey and high-resolution spectra were obtained with, respectively, 50 and 20 eV bandpass energies. Quantification of the elements on the sample surface was done using the proprietary system software. Deconvolution of the high-resolution spectra was done using XPS International software.<sup>28</sup> The Shirley method was used for background



subtraction of the spectra. The C1s line for C–C/C–H bonds at 285 eV<sup>29</sup> was used for all spectra binding energy corrections.

**Theoretical Methods.** Electronic and geometric properties of some oligomers with fluorene and benzothiadiazole groups were studied using *ab initio* and semiempirical quantum mechanical calculations. First, the geometry of the fluorene–benzothiadiazole unit was optimized with the DFT method using the Becke three-parameter, Lee–Yang–Parr functional (B3LYP),<sup>30</sup> which is a hybrid functional of exact (Hartree–Fock) exchange with local and gradient-corrected exchanges and correlation terms used in calculations of very large molecules.<sup>31</sup> A set of Gaussian Split-based Valence wave function basis was used.<sup>32</sup> For purposes of reliability in the calculations the geometry was previously optimized using the basic Gaussian split-valence 6-31G\* basis, which gives good ground state geometries for conjugated polymers.<sup>17,33</sup> These simulations were performed using the GAUSSIAN 09<sup>30</sup> package. DFT/B3LYP calculations with the 6-31G\* basis set running GAUSSIAN 09 were performed.

After that the geometry was simulated for oligomers with 1–6mers using semiempirical calculations. Each oligomer represented the previous optimized geometry of a smaller one increased by adding a new unit at both sides of the molecule. Due to lower computational load, all computational results discussed in this calculation were obtained performing calculations with the PM6 Hamiltonian contained in the MOPAC package.<sup>34</sup>

Finally, simulation of the LaPPS40 optical absorption spectrum was performed using ZINDO (Zerner's intermediate neglect of differential overlap/single)<sup>30</sup> running under the GAUSSIAN 09 program. The ZINDO transition energies were weighted by the oscillator strength values. The theoretically calculated values were used to assign the orbital related with the experimental data of the HOMO–LUMO optical transition

### 3. RESULTS AND DISCUSSION

**Polymer Characterization.** The molar mass of poly[9,9-bis(3'-(*tert*-butyl propanoate))fluorene-*co*-4,7-(2,1,3-benzothiadiazole)] (LaPPS40) as determined by GPC using polystyrene as standards was  $\bar{M}_w = 32\,000\text{ g mol}^{-1}$  with a polydispersity (PDI) of 1.40. The polymer showed good solubility in organic solvents such as CHCl<sub>3</sub>, THF, and dichloromethane, among others. It could be collected as fibrous strands and formed homogeneous, self-supporting, and continuous films by casting from solutions. These properties indicated that the real molar mass of the polymer was probably larger than that obtained from GPC data, based on polystyrene standards. Figure 2 shows typical SEM images of the solid state polymer,



Figure 2. SEM images of the LaPPS40 in as-cast solid state.

presenting a peculiar micrometric ribbon-like structure. The ribbons are composed of nanometric structures with porous characteristics. The amorphous nature of the material was confirmed by X-ray diffraction analysis (diffractogram not shown).

The chemical structure was confirmed by <sup>1</sup>H NMR, <sup>13</sup>C NMR, and IR spectroscopies, as presented in the Experimental Section and shown in the Supporting Information. The thermal stability of the polymer was studied using TGA, showing that the LaPPS40 (ester form) is thermally stable until 200 °C under nitrogen atmosphere. At this temperature, a mass loss about 20% was observed, assigned to breaking of the ester link (Table 1). No other thermal transitions were observed in DSC

Table 1. Results of XPS Analysis for the LaPPS40 Polymer and Some Theoretically Data for an Oligomer with Three Repeating Units

| element | XPS (%) | theoretical (%) | binding energy (eV) (XPS) | binding energy (eV) (theoretical) <sup>a</sup> |
|---------|---------|-----------------|---------------------------|--|
| S       | 2.5     | 2.5             | 165.37/166.54             | 162.85/163.24                                  |
| C       | 81.2    | 82.5            | 285–289                   | 276.66–280.82                                  |
| N       | 4.4     | 5               | 399.75                    | 391.38   |
| O       | 11.9    | 10              | 533.0                     | 521.63   |
| C–C/C–H | 70.4    | 72.5            | 285.0                     | 276.66   |
| C–O     | 5.8     | 5.0             | 287.0                     | 277.79   |
| C=O     | 5.0     | 5.0             | 289.0                     | 280.82   |

<sup>a</sup>Estimated using the *ab initio* method.

measurements in the 50–300 °C temperature range (shown in the Supporting Information).

**LaPPS40 Electronic Properties.** Table 1 shows some results of the XPS measurements. The Sp<sub>3/2</sub> and Sp<sub>1/2</sub> N<sub>1s</sub> and O<sub>1s</sub> binding energies were in excellent agreement with published results for similarly bonded polymers.<sup>35</sup> The binding energies of the various carbon bonds also agree with the relative shifts to the C–C/C–H bonds at 285 eV. Figure 3 shows the high-resolution spectrum for the C1s line of the LaPPS40 polymer. Deconvolution of the spectrum leads to quantification of the C–C/C–H, C–O, and C=O bonds. The calculated

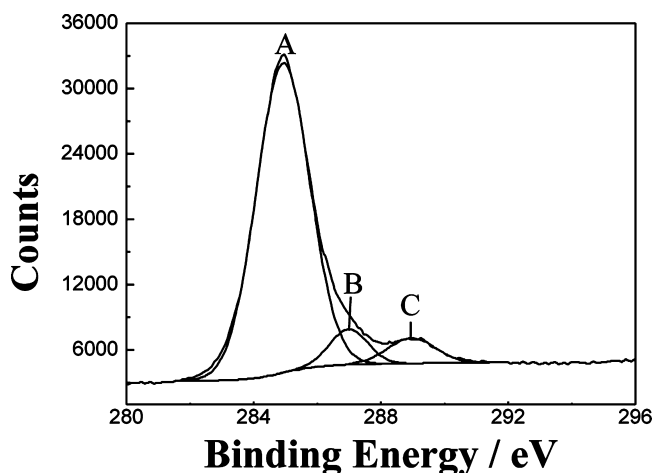
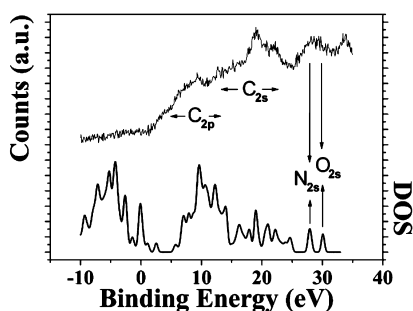


Figure 3. High-resolution XPS spectrum of the C<sub>1s</sub> line of the LaPPS40 polymer: (A) C–C/C–H bonds, (B) C–O bonds, and (C) C=O bonds.

atomic percentage and binding energies of these bonds are shown in Table 1.

Figure 4 shows the valence band spectrum of the LaPPS40 polymer obtained with XPS, adequately shifted in energy. The



**Figure 4.** Valence band spectrum of the LaPPS40 polymer obtained by XPS compared to the density of states of the theoretical simulation.

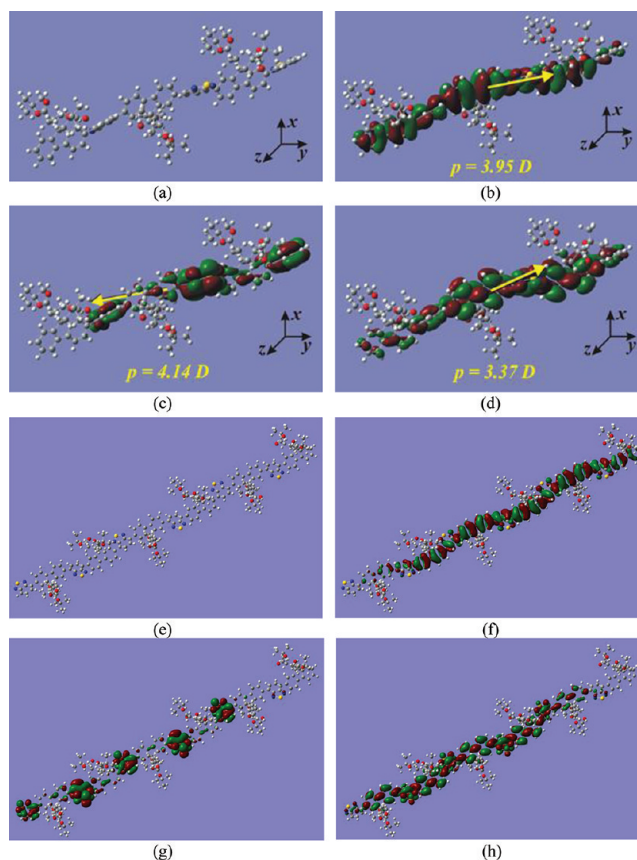
valence band below the Fermi level is dominated by the  $C_{2p}$  and  $C_{2s}$  bands, and the main peaks of the spectrum are reproduced by the theoretical density of states calculation shown in the same figure. The overall agreement of quantification for the XPS results as compared to the theoretically expected was very good.

Since the DFT calculation and semiempirical method showed similar results for optimization of the repeating unit and due to lower computational load the computational results discussed were obtained performing calculations with the PM6 Hamiltonian (semiempirical method). The geometry of the oligomer containing three and six repeating units is shown in Figure 5a and 5e, respectively. The optimized geometry and corresponding energies of the HOMO–LUMO orbitals are shown on Figure 5b–d (for three units) and 5f–h (for six units). The calculation indicates that the fluorene units in the  $n$ -mers are in a planar configuration, but their relative orientation relative to the benzothiadiazole groups is almost orthogonally oriented in the electronic ground state (Figure 5a and 5e). Since the simulations using three or six repeating units show the same geometry and similar electronic density, due to computational resources the compound model with three repeating units was used as the LaPPS40 representative unit for absorption transitions (Figure 10) and core energy levels (Figure 4).

The moduli of the dipole moments for every state did not vary significantly, as shown in Figure 5 ( $p$  values), but their spatial orientation suffered appreciable changes as shown at Table 2 by analysis of the  $x, y, z$  components.

Single-point calculations were initially performed, and the values for the HOMO and LUMO were obtained for oligomers with 1–6mers using the same functional and the same wave function basis set. The convergence of the energy values is shown in Figure 6a. It is noteworthy that the theoretical data were also consistent with those determined experimentally by XPS for the valence band spectrum of LaPPS40 (Table 1).

Figure 6b shows the theoretical energy band gap as a function of the inverse of the number of repeating units ( $1/n$ ). The relationship between these two parameters can be described by an exponential approach given by the Meyer-type equation.<sup>36</sup> It indicates that the polymer reaches a better convergence for the hexamer, and that value could be extrapolated to the “ideal” infinite polymer (see Supporting Information). Nevertheless, the three-unit model was used



**Figure 5.** Electronic ground state optimized geometry for an oligomer with three (a–d) and six repeating units (e–h). Charge density distribution for the HOMO orbital (b and f),  $S_1$  (LUMO) orbital (c and g), and  $S_4$  (LUMO+3) orbital (d and h) (isovalues 0.01). (Inset) Arrows representing the Cartesian dipole moment orientation for 3 repeating units ( $p$ ).

since it saves computational resources and provided good agreement with experimental data.

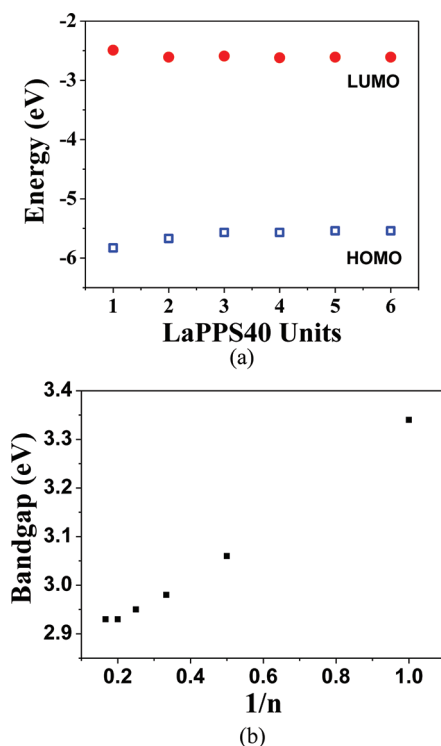
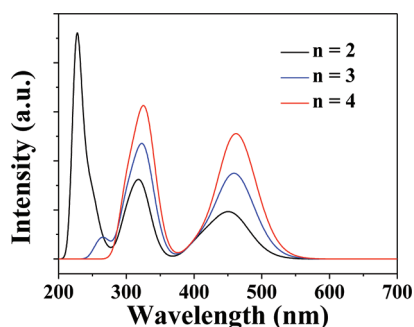
The energy of the HOMO and LUMO levels for the three repeating units is satisfactory when compared with the experimental data from cyclic voltammetry and from the optical absorption spectrum (see below). This fact does not mean that the effective conjugation of the polymer is reached with only three monomeric units, but it gives support to perform the quantum mechanical calculations over three repeating units.

On the basis of the semiempirical optimized geometry for the oligomer with two, three, and four repeating units and on theoretical calculations for the orbital energies, evolution of the theoretical absorbance spectra is shown in Figure 7. The spectral shape with a “camel back” character is known to be a signature of the donor–acceptor copolymer structure with an ICT state.<sup>10</sup>

Using the calculated data for the oligomer with three repeating units the contribution of the valence molecular orbitals to the lower energy electronic transitions was analyzed. Assuming that the transition is purely electronic in vacuum and that no vibrational coupling is involved, the higher energy absorption band may be attributed to the  $\pi$ – $\pi^*$  transition ( $S_0 \rightarrow S_4$ ; with a major contribution of HOMO  $\rightarrow$  LUMO+3), with an oscillator strength of 1.0604 (Table 3). This transition brings about an excited state with a calculated electric dipole of

Table 2. Dipole Moments for the Excited and Ground State of LaPPS40 Repeating Units

|                    |       | dipole moment components (Debye) |         |         |         |         |         | dipole moment $p$ (Debye) |         |
|--------------------|-------|----------------------------------|---------|---------|---------|---------|---------|---------------------------|---------|
|                    |       | $p_x$                            |         | $p_y$   |         | $p_z$   |         | $n = 3$                   | $n = 6$ |
|                    |       | $n = 3$                          | $n = 6$ | $n = 3$ | $n = 6$ | $n = 3$ | $n = 6$ |                           |         |
| excited state      | $S_1$ | 4.148                            | 7.618   | −0.018  | 0.052   | 0.032   | 0.188   | 4.14                      | 7.62    |
|                    | $S_4$ | −3.374                           | −1.474  | 0.028   | −0.012  | −0.023  | −0.175  | 3.37                      | 1.48    |
| ground state $S_0$ |       | −3.531                           | 6.941   | 1.184   | 0.320   | −1.332  | 0.851   | 3.95                      | 7.00    |

Figure 6. Calculated HOMO and LUMO energy levels for LaPPS40 repeating units (a), and theoretical band energy gap versus  $1/n$  (where  $n$  is the number of repeating units) (b).Figure 7. Theoretical absorption spectra of LaPPS40 repeating units ( $n$ ).

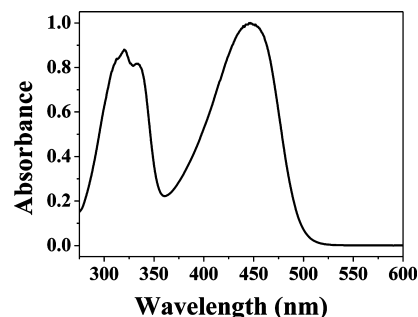
3.37 D, lower than that of the electronic ground state 3.95 D, but the dipole moments maintained a similar spatial orientation. The charge distribution map for this excited state can be seen at Figure 5d, where the electronic cloud is spread over the main chain in a similar fashion as in the electronic ground state (Figure 5b). The lower energy absorption band may be ascribed to the transition between  $S_0$  and  $S_1$ , with a major contribution of HOMO→LUMO (Figure 5c). Comparing with the HOMO (Figure 5b), the charge distribution map

Table 3. Major Transition Contributions to Theoretically Simulated Electronic Absorption Spectra for an Oligomer with Three Repeating Units

| theoretical wavelength (nm) | oscillator strength | transition      | contribution (%) |
|-----------------------------|---------------------|-----------------|------------------|
| 326                         | 1.0604              | HOMO → LUMO+3   | 17               |
|                             |                     | HOMO−2 → LUMO+5 | 6                |
|                             |                     | HOMO−1 → LUMO+4 | 7                |
|                             |                     | HOMO → LUMO+4   | 9                |
| 461                         | 1.1319              | HOMO−1 → LUMO+2 | 13               |
|                             |                     | HOMO → LUMO     | 38               |
|                             |                     | HOMO−3 → LUMO+2 | 6                |
|                             |                     | HOMO → LUMO+2   | 7                |

for this excited state clearly shows a charge transfer from the fluorene to the benzothiadiazole units, and thus, the transition undergoes a clear character of an intramolecular charge transfer (ICT) between the donor and the acceptor. It is noteworthy that although the magnitude of the calculated dipole moments does not change much (from 3.95 to 4.14 D) there is an inversion of their spatial orientation.

**LaPPS40 Optical Properties.** Figure 8 shows the optical electronic absorption spectra of LaPPS40 in chloroform

Figure 8. Electronic absorption spectrum of LaPPS40 solution in chloroform ( $10^{-5}$  mol  $L^{-1}$ ).

solution ( $10^{-5}$  mol  $L^{-1}$ ). The spectrum displays two absorption maxima located at  $\lambda_{\max} = 317$  and 445 nm (3.91 and 2.79 eV, respectively), relatively close to the calculated values (Table 2). The oxidation and reduction potentials of LaPPS40 were also determined by cyclic voltammetry (Supporting Information), and the values for the HOMO and LUMO levels were determined as −5.60 and −3.07 eV, respectively, using the equations<sup>1,37,38</sup>

$$E_a(E_{\text{LUMO}}) = (E'_{\text{red}} + 4.5) \text{ eV} \quad (2)$$

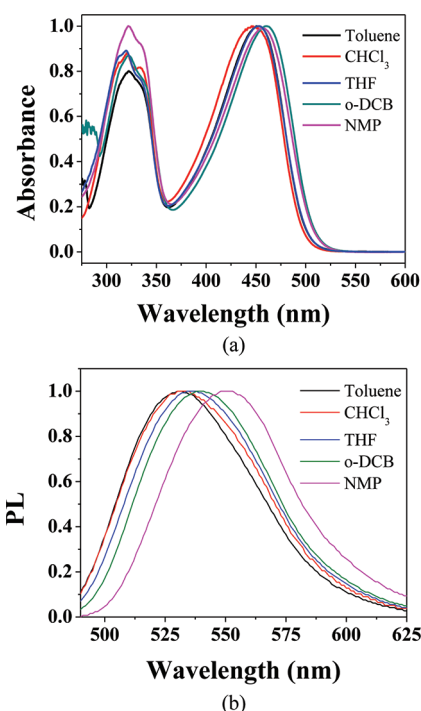
$$I_p(E_{\text{HOMO}}) = (E'_{\text{ox}} + 4.5) \text{ eV} \quad (3)$$



where  $E_a$  is the electron affinity and  $I_p$  is the ionization potential.  $E'_{red}$  and  $E'_{ox}$  are the onset reduction and oxidation potentials versus the SHE reference electrode.

Taking into account the approximations used in the theoretical information, these two bands can be ascribed to transitions from HOMO  $\rightarrow$  LUMO+3 and to the HOMO  $\rightarrow$  LUMO where a charge transfer occurs from the fluorene to the benzothiadiazole units.

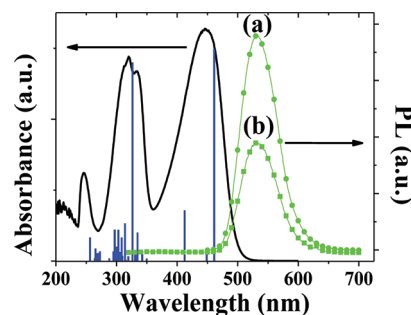
To confirm experimentally the ICT character of this polymer, the electronic absorption spectra of LaPPS40 solutions ( $10^{-5}$  mol L $^{-1}$ ) in solvents with different polarities were studied (toluene, chloroform, tetrahydrofuran (THF), *o*-dichlorobenzene (*o*-DCB), and *N*-methyl pyrrolidone (NMP)) (Figure 9a). This figure shows that the higher energy  $\pi$ - $\pi^*$



**Figure 9.** Normalized electronic absorption (a) and photoluminescence spectra ( $\lambda_{exc} = 445$  nm) (b) of LaPPS40 in different solvents ( $10^{-5}$  mol L $^{-1}$ ).

transition is practically independent of solvent polarity, but the lower energy band shifts toward the red by 10 nm from toluene to NMP solutions (data in Table 3). The absence of spectral dependence of the higher energy band with the solvent polarity may be explained by the small changes of the dipole moments from 3.95 to 3.37 D (Figure 5) without significant change of its spatial orientation. Therefore, because there is only a small change of the electron density over the polymer chain we should not anticipate a major reorientation of the solvation layer around the macromolecule upon electronic excitation. On the contrary, for the  $S_0 \rightarrow S_1$  electronic absorption there is a spectral red shift in polar compared to nonpolar solvents, confirming the ICT character of this transition. Since the change in magnitude of the dipole moment is also small, this character must arise from the changes of its spatial orientation. Due to the change in charge distribution, the solvation layer must be reordered around the polymer chain after the electronic transition and this relaxation of the solvent leads to a larger red shift of the photoluminescence spectra.

The photoluminescence (PL) spectrum for LaPPS40 in chloroform solution in Figure 10 shows a peak centered at  $\lambda_{em}$



**Figure 10.** Electronic absorption and photoluminescence spectra of LaPPS40 in chloroform solution ( $10^{-5}$  mol L $^{-1}$ ): (a)  $\lambda_{exc} = 445$  nm and (b)  $\lambda_{exc} = 317$  nm. Blue columns indicate the theoretically calculated oscillator strengths.

= 532 nm, independently of the excitation energy at  $\lambda_{exc} = 317$  (which is resonant with the higher energy absorption) or 445 nm (with is resonant with the lower energy absorption). This indicates that when fluorene groups are preferentially excited there is a fast energy or charge transfer toward the lower lying excited state, which is responsible for the emission. This type of behavior has been reported for several types of copolymers containing donor and acceptor groups.<sup>10,39,40</sup> In addition, the emission band is a mirror image of the absorption, with a Stokes shift of 3674 cm $^{-1}$ . This shift is significantly smaller than that observed for other conjugated polymers and copolymers, showing that the benzothiadiazole groups in the  $S_1$  electronic excited state do not undergo additional energy migration, energy transfer processes, or conformational relaxation.<sup>39,41</sup> Thus, since no fluorene-related emission band is observed, the electron-deficient benzothiadiazole unit dominates the radiative process.<sup>42</sup>

The solvatochromic properties of LaPPS40 were further explored using steady-state photoluminescence in solutions with the same solvents used for the absorption. Figure 9b shows these emission spectra ( $10^{-4}$  mol L $^{-1}$ ) ( $\lambda_{exc} = 445$  nm). A stronger red shift was observed, according to increasing solvent polarity. Table 4 displays the results in numerical form.

The correlation between the solvatochromic behavior and the solvent properties is in general very complex, but it can be described in a simplified form by the Lippert–Mataga equation, eq 4, under the approximation that the solvent forms a continuous dielectric field around the solute molecules<sup>26</sup>

$$\begin{aligned} \Delta\bar{\nu} &= \bar{\nu}_{abs} - \bar{\nu}_{PL} \\ &= \frac{2}{hc} \left( \frac{\epsilon - 1}{2\epsilon + 1} - \frac{n^2 - 1}{2n^2 + 1} \right) \left[ \frac{(\mu_E - \mu_G)^2}{a^3} \right] + cte \\ &= \frac{2}{hc} \Delta f \left[ \frac{(\mu_E - \mu_G)^2}{a^3} \right] + cte \end{aligned} \quad (4)$$

where  $\bar{\nu}_{abs}$  and  $\bar{\nu}_F$  are the absorption emission energies in cm $^{-1}$ , respectively,  $h$  is the Planck constant,  $c$  is the light speed,  $\epsilon$  for the dielectric constant,  $n$  for the refractive index of the solvent,  $\mu_E$  and  $\mu_G$  for the dipole moments of the electronic excited and electronic ground states, respectively,  $a$  for the radius of the solvent cavity where the solute molecule is located and  $\bar{\nu}_{abs} - \bar{\nu}_{PL}$  for the Stokes's shift.  $\Delta f$  is known as the solvent

Table 4. Spectral Data for LaPPS40 in Solutions, Concentration  $10^{-5}$  mol L $^{-1}$ , and Some Solvent Properties

|                   | solvent properties |          |                  | $\lambda_{\text{abs}}(A_1)$ (nm) | $\lambda_{\text{abs}}(A_2(\text{ICT}))$ (nm) | $\lambda_{\text{PL}}$ (nm) <sup>c</sup> | Stokes shift  |
|-------------------|--------------------|----------|------------------|----------------------------------|--|---|---|
|                   | $\mu^a$ (D)        | $n^{43}$ | $\epsilon^{b43}$ |                                  |  |   | $\bar{\nu}_{\text{abs}}(A_1) - \bar{\nu}_{\text{PL}}$ (cm $^{-1}$ ) |
| toluene           | 0.37               | 1.496    | 2.385            | 322                              | 453  | 530                                     | 12 188  |
| CHCl <sub>3</sub> | 1.04               | 1.445    | 4.807            | 320                              | 447  | 532                                     | 12 453  |
| THF               | 1.75               | 1.407    | 7.52             | 322                              | 452  | 535                                     | 12 365  |
| <i>o</i> -DCB     | 2.50               | 1.551    | 9.93             | 322                              | 461  | 540                                     | 12 538  |
| NMP               | 4.09               | 1.47     | 32.2             | 322                              | 457  | 552                                     | 12 940  |

<sup>a</sup> $\mu$  is the dipole moment and  $n$  the refractive index. <sup>b</sup> $\epsilon$  is the dielectric constant and ICT the internal charge transfer complex. <sup>c</sup> $\lambda_{\text{exc}} = 445$  nm. THF, tetrahydrofuran; *o*-DCB, *o*-dichlorobenzene; NMP, *N*-methyl pyrrolidone.  $\lambda_{\text{abs}}(A_1)$  = wavelength absorption of the first peak,  $\lambda_{\text{abs}}(A_2)$  = wavelength absorption of the second peak.

polarizability. Although this is a rough approximation for polymer molecules which are not of spherical shape in solution, Figure 11 shows that the Lippert–Mataga plot is approximately

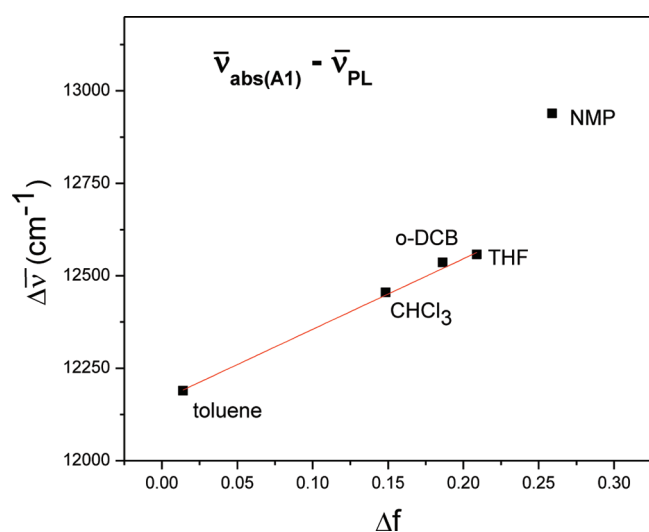


Figure 11. Lippert–Mataga plot showing the dependence of the Stokes shift with the solvent polarizability  $\Delta f$  (see eq 4).

linear (correlation coefficient equal to 0.8166 when NMP is included and 0.9955 when it is excluded).

The solvatochromic properties using steady-state emission also gave some insights about the changes of the charge density along the benzothiadiazole groups, which have been confirmed by the dependence of the emission with the solvent polarity, but no information about the dynamics of the solvation can be inferred. For LaPPS40 in chloroform solution, the steady-state emission was also independent of the excitation wavelength, indicating that the charge transfer is a very fast process.

The dynamics of the PL process was initially studied by recording the emission decay with laser pulses at  $\lambda_{\text{exc}} = 375$  nm (where fluorene groups were excited) and 470 nm (where only benzothiadiazole units are excited) and collecting the emission signals at  $\lambda_{\text{em}} = 550$  nm (data in Table 5). Data analyses were performed using multiple exponential functions according to eq 1, and good fits were obtained with biexponential functions for all solvents, with a predominant faster component (higher  $B$  values). There is no straightforward correlation between the decay values and the solvent properties (dielectric constants, Lippert–Mataga polarizability or solvent viscosity), although both decays for toluene (lower viscosity and lower dielectric constant) are faster than those for NMP. The contribution of the faster decay is always greater than the lower, but also no systematic correlation with the solvent properties has been

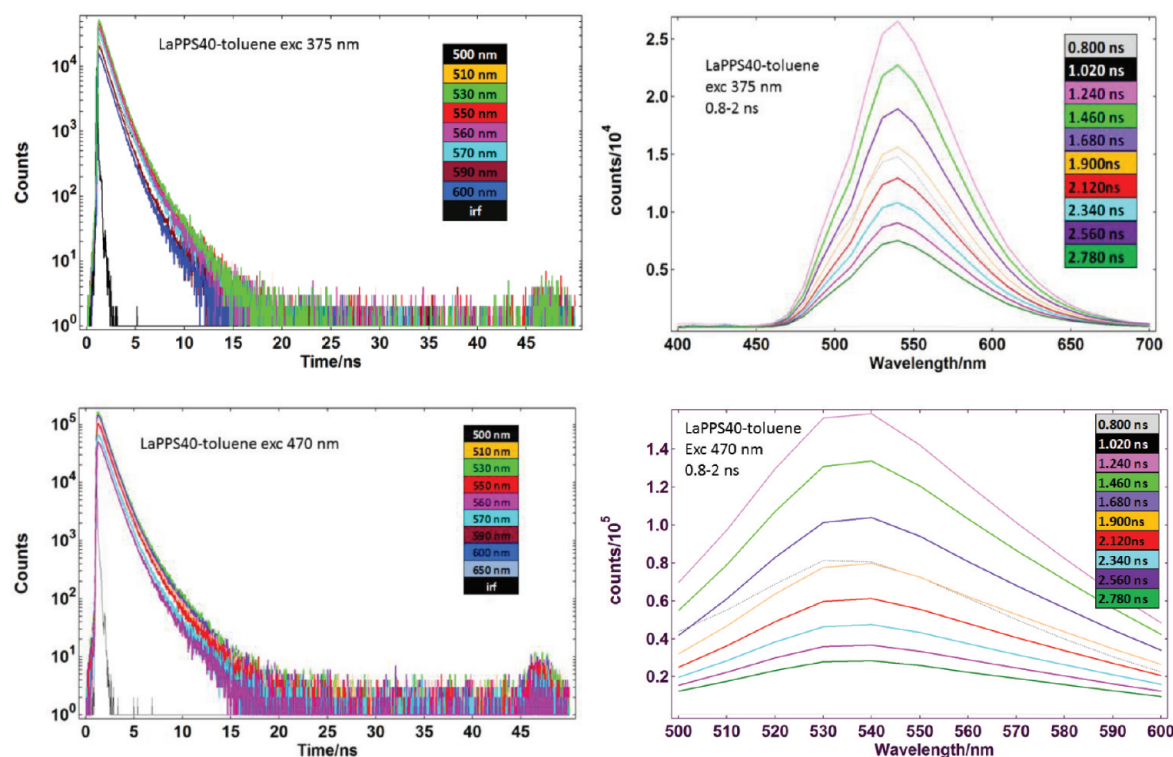
Table 5. Emission Decay Components for LaPPS40 in Solution<sup>a</sup>

| solvent              | $\tau_1$ (ns)     | $B_1$ (%) | $\tau_2$ (ns)     | $B_2$ (%) | $\chi^2$ |
|----------------------|-------------------|-----------|-------------------|-----------|----------|
| toluene 375 nm       | $0.755 \pm 0.007$ | 77        | $1.498 \pm 0.031$ | 23        | 1.001    |
| toluene 470 nm       | $0.759 \pm 0.007$ | 78        | $1.488 \pm 0.03$  | 22        | 1.000    |
| chloroform 375 nm    | $0.964 \pm 0.008$ | 67        | $2.099 \pm 0.02$  | 33        | 1.000    |
| chloroform 470 nm    | $0.904 \pm 0.008$ | 64        | $1.990 \pm 0.02$  | 36        | 1.000    |
| THF 375 nm           | $0.915 \pm 0.007$ | 73        | $1.982 \pm 0.03$  | 27        | 1.000    |
| THF 470 nm           | $0.880 \pm 0.007$ | 71        | $1.868 \pm 0.02$  | 29        | 1.000    |
| <i>o</i> -DCB 375 nm | $0.858 \pm 0.007$ | 80        | $1.795 \pm 0.04$  | 20        | 1.000    |
| <i>o</i> -DCB 470 nm | $0.811 \pm 0.007$ | 76        | $1.639 \pm 0.03$  | 24        | 1.000    |
| NMP 375 nm           | $1.084 \pm 0.009$ | 64        | $2.413 \pm 0.02$  | 36        | 1.000    |
| NMP 470 nm           | $0.942 \pm 0.009$ | 53        | $2.129 \pm 0.02$  | 47        | 1.000    |

<sup>a</sup>Concentration  $10^{-5}$  mol L $^{-1}$ ;  $\lambda_{\text{exc}} = 375$  nm, and  $\lambda_{\text{exc}} = 470$  nm.  $\lambda_{\text{em}} = 550$  nm.

obtained. It has been described that some conjugated polymers having ICT states may depict a clear trend of the emission peak position and lifetime with the solvent properties: solvents that bring about strong red shifts also induce a large increase in the lifetime.<sup>26,39</sup> This is not the case of the LaPPS40 copolymer, probably because there is a very small change of the dipole moment when the charge transfer occurs from the fluorene to the benzothiadiazole groups as shown by the quantum mechanical calculations.

Biexponential decays as observed here may arise from several different possibilities. Since only dilute solutions were used, interchain interactions, interchain aggregation, and interchain excimer or exciplex formation were not considered plausible processes. However, intralumophore interaction brought about by chain folding cannot be disregarded, in principle. Indeed, the calculated geometry showed that the copolymer chain is not planar, and therefore, for longer chains, the possibility of close proximity between lumophores belonging to the same chain may be greater. Because of the sensitivity of the chain conformation to the polymer–solvent interactions, solvents with different dielectric constants should have a selective influence on the chain conformation and thus on the intrachain lumophore interactions. If this were an important contribution to one component of the biexponential decay, the relative contribution of the faster and longer components should change from one solvent to another. The absence of a significant dependence of the relative contribution of both components with solvent polarity suggests that also intrachain lumophore interaction is not playing an important role.



**Figure 12.** Photoluminescence decays (acquisition time 60 s) and time-resolved spectra for LaPPS40 in the range between 0.800 and 2.000 ns in toluene solution using  $\lambda_{\text{exc}} = 375$  and 470 nm in several emission wavelengths.

Another possible explanation for the biexponential decay is that it arises from the presence of excited state lumophores in relaxed and unrelaxed CT states.<sup>40</sup> This possibility might be considered taking into account that for all solvents the faster component is obtained when using lower excitation energy (470 nm) that corresponds to the red edge of the benzothiadiazole absorption band. Emission from the relaxed state should be faster than from nonrelaxed states, and thus, it has been assumed that the faster emission arises from the relaxed Franck–Condon excited state of the benzothiadiazole directly excited using 470 nm.

The dynamics of the PL processes was also monitored for LaPPS40 in toluene solution using the same two excitation wavelengths (375 and 470 nm) and following the decay in the emission range from 400 to 700 nm (Figure 12). These decays were accumulated during 60 s. The decay patterns (left) are practically independent of the emission wavelengths where the decay is recorded. This is a typical behavior for localized lumophore excitation without spectral evolution by energy migration, energy transfer, or charge transfer processes, conformational relaxation, or strong solvent relaxation around the lumophore.<sup>26,39,40</sup> Moreover, time-resolved spectra are also time independent and similar to those observed under steady-state conditions.

Putting all the data together, the kinetic model for LaPPS40 decay seems to be very simple: when the donor is excited, it undergoes a very fast ICT process creating the electronic excited acceptor. However, because of the time resolution used in the present work is limited to 90 ps, we cannot go deeper into this mechanism. What can be said is that since the donor emission is absent the ICT process must be faster than the donor decay (around 100 ps to 1 ns for polyfluorenes). This requires an intrachain process with the donor and acceptor in close proximity, since the ICT process is very fast (<100 fs).<sup>44</sup>

This close proximity in LaPPS40 is clearly achieved by the alternated structure.

#### 4. CONCLUSIONS

Poly[9,9-bis(3'-(*tert*-butylpropanoate))fluorene-*co*-4,7-(2,1,3-benzothiadiazole)] (LaPPS40) was successfully synthesized via the Suzuki route. Theoretical and photophysical studies have shown that this polymer has D–A character with intrachain charge transfer processes. The absorbance spectra of LaPPS40 indicate two dominant electronic transitions: a  $\pi$ – $\pi^*$  ( $S_0 \rightarrow S_4$ ; HOMO  $\rightarrow$  LUMO+3) transition more located over the fluorene groups, and a transition from  $S_0$  to  $S_1$  (HOMO  $\rightarrow$  LUMO) more located over the benzothiadiazole groups conferring an intramolecular charge transfer character (ICT). Theoretical calculations showed that the magnitude of the changes of the dipole moments after excitation for both electronic states is small, but their spatial orientation changed remarkably as a result of the ICT character of the electronic transitions. It was shown from the spectral studies in solvents with different polarities that the ICT band is the most sensitive to solvatochromic effects. Solvatochromism can be well described by the Lippert–Mataga equation, and this result is consistent with the small changes of the magnitude of the dipole moments as the theoretical calculations demonstrated. According to the time resolution used, the dynamics of the emission suggests a model where two types of benzothiadiazole groups might be present, which would be responsible by the biexponential decays. These two decays are not related to interlumophore interactions but with lumophores in relaxed and unrelaxed forms.



## ■ ASSOCIATED CONTENT

## ■ Supporting Information

Additional results for  $^1\text{H}$  and  $^{13}\text{C}$  NMR spectra, infrared spectra, cyclic voltammogram of LaPPS40, thermogravimetric data of LaPPS40, DSC curve of LaPPS40, convergence of the  $E_g$  with increasing number  $n$  of repeating units. This material is available free of charge via the Internet at <http://pubs.acs.org>.

## ■ AUTHOR INFORMATION

## Corresponding Author

\*E-mail: [leni@leniak.net](mailto:leni@leniak.net).

## Author Contributions

<sup>‡</sup>These authors contributed equally to this work.

## Notes

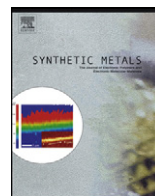
The authors declare no competing financial interest.

## ■ ACKNOWLEDGMENTS

Thanks to MSc Bruno B. Torres for NMR data, FAPESP, CNPq, National Institute of Organic Electronics (INEO), INCT–Diagnósticos para a Saúde Pública, Brazilian Agencies for financial support and fellowships.

## ■ REFERENCES

- (1) Inganas, O.; Zhang, F.; Tvingstedt, K.; Andersson, L. M.; Hellstrom, S.; Andersson, M. R. *Adv. Mater.* **2010**, *22*, E100–E116.
- (2) Veldman, D.; Meskers, S. C. J.; Janssen, R. A. J. *Adv. Funct. Mater.* **2009**, *19*, 1939–1948.
- (3) Wu, P.-T.; Kim, F. S.; Champion, R. D.; Jenekhe, S. A. *Macromolecules* **2008**, *41*, 7021–7028.
- (4) Dennler, G.; Scharber, M. C.; Brabec, C. J. *Adv. Mater.* **2009**, *21*, 1323–1338.
- (5) Beaujuge, P. M.; Amb, C. M.; Reynolds, J. R. *Acc. Chem. Res.* **2010**, *43*, 1396–1407.
- (6) van Mullekom, H. A. M.; Vekemans, J. A. J. M.; Havinga, E. E.; Meijer, E. W. *Mater. Sci. Eng., R* **2001**, *32*, 1–40.
- (7) Lippert, E. Z. *Naturforsch.* **1955**, *IOA*, 5412.
- (8) Mataga, N.; Kaifu, Y.; Koizumi, M. *Bull. Chem. Soc. Jpn.* **1956**, *29*, 465.
- (9) Hung, Y.-C.; Jiang, J.-C.; Chao, C.-Y.; Su, W.-F.; Lin, S.-T. *J. Phys. Chem. B* **2009**, *113*, 8268–8277.
- (10) Jespersen, K. G.; Beenken, W. J. D.; Zaushtsyn, Y.; Yartsev, A.; Andersson, M.; Pullerits, T.; Sundstrom, V. *J. Chem. Phys.* **2004**, *121*, 12613–12617.
- (11) Hall, L. M.; Jayaraman, A.; Schweizer, K. S. *Curr. Opin. Solid State Mater. Sci.* **2010**, *14*, 38–48.
- (12) Li, Y.; Li, H.; Xu, B.; Li, Z.; Chen, F.; Feng, D.; Zhang, J.; Tian, W. *Polymer* **2010**, *51*, 1786–1795.
- (13) Wu, P.-T.; Bull, T.; Kim, F. S.; Luscombe, C. K.; Jenekhe, S. A. *Macromolecules* **2009**, *42*, 671–681.
- (14) Cheng, Y.-J.; Yang, S.-H.; Hsu, C.-S. *Chem. Rev.* **2009**, *109*, 5868–5923.
- (15) Ko, S.; Mondal, R.; Risko, C.; Lee, J. K.; Hong, S.; McGehee, M. D.; Brédas, J. L.; Bao, Z. *Macromolecules* **2010**, *43*, 6685–6698.
- (16) Canestraro, C. D.; Rodrigues, P. C.; Marchiori, C. F. N.; Schneider, C. B.; Akcelrud, L.; Koehler, M.; Roman, L. S. *Solar Energy Mater. Solar Cells* **2011**, *95*, 2287–2294.
- (17) Hsu, S.-L.; Chen, C.-M.; Wei, K.-H. *J. Polym. Sci., Part A: Polym. Chem.* **2010**, *48*, 5126–5134.
- (18) Chen, C.-H.; Hsieh, C.-H.; Dubosc, M.; Cheng, Y.-J.; Hsu, C.-S. *Macromolecules* **2010**, *43*, 697–708.
- (19) Liang, Y.; Xu, Z.; Xia, J.; Tsai, S.-T.; Wu, Y.; Li, G.; Ray, C.; Yu, L. *Adv. Mater.* **2010**, *22*, E135–E138.
- (20) Mühlbacher, D.; Scharber, M.; Morana, M.; Zhu, Z.; Waller, D.; Gaudiana, R.; Brabec, C. *Adv. Mater.* **2006**, *18*, 2884–2889.
- (21) Park, S. H.; Roy, A.; Beaupré, S.; Cho, S.; Coates, N.; Moon, J. S.; Moses, D.; Leclerc, M.; Lee, K.; Heeger, A. J. *Nat. Photonics* **2009**, *3*, 297–302.
- (22) Oh, S.-H.; Na, S.-I.; Nah, Y.-C.; Vak, D.; Kim, S.-S.; Kim, D.-Y. *Org. Electron.* **2007**, *8*, 773–783.
- (23) Feng, F.; Duan, X.; Wang, S. *Macromol. Rapid Commun.* **2009**, *30*, 147–151.
- (24) Xing, C.; Liu, L.; Shi, Z.; Li, Y.; Wang, S. *Adv. Funct. Mater.* **2010**, *20*, 1–6.
- (25) Liu, X.; Zhu, R.; Zhang, Y.; Liu, B.; Ramakrishna, S. *Chem. Commun.* **2008**, *32*, 3789–3791.
- (26) Valeur, B. *Molecular Fluorescence: Principles and Applications*; Wiley-VCH Verlag GmbH: Weinheim, Germany, 2001.
- (27) Andrade, M. L.; Atvars, T. D. Z. *J. Braz. Chem. Soc.* **2006**, *17*, 1000–1013.
- (28) XPS International SDP V. 32.2; Mountain View, CA.
- (29) Beamson, G.; Briggs, D. *High resolution XPS of Organic Polymers. The Scienta ESCA300 Database*; John Wiley: Chichester, U.K., 1992.
- (30) Lee, C.; Yang, W.; Parr, R. G. *Phys. Rev. B* **1988**, *37*, 785–789.
- (31) Stephens, P. J.; Devlin, F. J.; Chabalowski, C. F.; Frisch, M. J. *J. Phys. Chem.* **1994**, *98*, 11623–11627.
- (32) Frisch, M. J.; Trucks, G. W.; Schlegel, H. B.; Scuseria, G. E.; Robb, M. A.; Cheeseman, J. R.; Scalmani, G.; Barone, V.; Mennucci, B.; Petersson, G. A.; Nakatsuji, H.; Caricato, M.; Li, X.; Hratchian, H. P.; Izmaylov, A. F.; Bloino, J.; Zheng, G.; Sonnenberg, J. L.; Hada, M.; Ehara, M.; Toyota, K.; Fukuda, R.; Hasegawa, J.; Ishida, M.; Nakajima, T.; Honda, Y.; Kitao, O.; Nakai, H.; Vreven, T.; Montgomery, J. A., Jr.; Peralta, J. E.; Ogliaro, F.; Bearpark, M.; Heyd, J. J.; Brothers, E.; Kudin, K. N.; Staroverov, V. N.; Kobayashi, R.; Normand, J.; Raghavachari, K.; Rendell, A.; Burant, J. C.; Iyengar, S. S.; Tomasi, J.; Cossi, M.; Rega, N.; Millam, J. M.; Klene, M.; Knox, J. E.; Cross, J. B.; Bakken, V.; Adamo, C.; Jaramillo, J.; Gomperts, R.; Stratmann, R. E.; Yazyev, O.; Austin, A. J.; Cammi, R.; Pomelli, C.; Ochterski, J. W.; Martin, R. L.; Morokuma, K.; Zakrzewski, V. G.; Voth, G. A.; Salvador, P.; Dannenberg, J. J.; Dapprich, S.; Daniels, A. D.; Ö. Farkas, Foresman, J. B.; Ortiz, J. V.; Cioslowski, J.; Fox, D. J. *Gaussian 09, Revision B.01*; Gaussian, Inc.: Wallingford, CT, 2009.
- (33) Lin, B. C.; Cheng, C. P.; Lao, Z. P. *J. Phys. Chem. A* **2003**, *107*, 5241–5251.
- (34) MOPAC2009, Stewart, J. P., *Stewart Computational Chemistry*, Colorado Springs, CO, USA, <http://openmopac.net> (2008).
- (35) Rodrigues, P. C.; Lisboa-Filho, P. N.; Mangrich, A. S.; Akcelrud, L. *Polymer* **2005**, *46*, 2285–2296.
- (36) Meier, H.; Stalmach, U.; Kolshorn, H. *Acta Polym.* **1997**, *48*, 379–384.
- (37) Pavlishchuk, V. V.; Addison, A. W. *Inorg. Chim. Acta* **2000**, *298*, 97–102.
- (38) Admassie, S.; Inganas, O.; Mammo, W.; Perzon, E.; Andersson, M. R. *Synth. Met.* **2006**, *156*, 614–623.
- (39) Winfield, J. M.; Vooren, A. V.; Park, M.-J.; Hwang, D.-H.; Cornil, J.; Kim, J.-S.; Friend, R. H. *J. Chem. Phys.* **2009**, *131*, 035104–1–035104–5.
- (40) Redecker, M.; Bradley, D. C.; Baldwin, K. J.; Smith, D. A.; Inbasekaran, M.; Wu, W. W.; Woo, E. P. *J. Mater. Chem.* **1999**, *9*, 2151–2154.
- (41) Dias, F. B.; Pollock, S.; Helly, G.; Palsson, L.-O.; Monkman, A. J. *Phys. Chem. B* **2006**, *110*, 19329–19339.
- (42) Kulkarni, A. P.; Zhu, Y.; Babel, A.; Wu, P.-T.; Jenekhe, S. A. *Chem. Mater.* **2008**, *20*, 4212–4223.
- (43) Dean, J. A. *Lange's Handbook of Chemistry*, 15th ed.; McGraw-Hill, Inc.: New York, 1998.
- (44) Grabowski, Z. R.; Rotkiewicz, K.; Rettig, W. *Chem. Rev.* **2003**, *103*, 3899–4031.



# Photophysical properties of a fluorene–bipyridine copolymer and its complexes with europium

D.A. Turchetti<sup>a</sup>, P.C. Rodrigues<sup>a</sup>, L.S. Berlim<sup>b</sup>, C. Zanolorenzi<sup>c</sup>, G.C. Faria<sup>d</sup>, T.D.Z. Atvars<sup>e</sup>, W.H. Schreiner<sup>b</sup>, L.C. Akcelrud<sup>a,\*</sup>

<sup>a</sup> Paulo Scarpa Polymer Laboratory (LaPPS), Federal University of Parana, CP 19081, CEP 81531-980, Curitiba, Parana, Brazil

<sup>b</sup> Laboratory of Surfaces and Interfaces (LSI), Federal University of Parana, CP 19081, CEP 81531-980, Curitiba, Parana, Brazil

<sup>c</sup> Chemistry Department, Federal University of Parana, CP 19081, CEP 81531-980, Curitiba, Parana, Brazil

<sup>d</sup> Laboratory of High Resolution Spectroscopy (LEAR), Institute of Physics of Sao Carlos, University of Sao Paulo, CP 369, CEP 13560-970, São Carlos, Sao Paulo, Brazil

<sup>e</sup> Institute of Chemistry, State University of Campinas (Unicamp), Caixa Postal 6154, Campinas/SP, 13084-971, Brazil

## ARTICLE INFO

### Article history:

Received 1 July 2011

Received in revised form 26 October 2011

Accepted 10 November 2011

Available online 14 December 2011

### Keywords:

Europium complexes

Fluorene

Bipyridine copolymers

Photophysical properties

## ABSTRACT

The synthesis and structural characterization of a europium complexed fluorene–bipyridine copolymer are described. A level of ion insertion of 80% in molar basis was achieved, and theoretical calculations showed that it required a twist of 179° (49 kJ) between the pyridine units. Spectroscopy data showed that no electronic coupling between the main backbone and the complexation sites had occurred, but these hindered the interchain aggregation observed in the non complexed polymer.

Preliminary electroluminescence studies showed that the EL and PL spectra are consistent, and that the ion had a trapping effect in the charge transport.

© 2011 Elsevier B.V. All rights reserved.

## 1. Introduction

The variety of applications found and forecast by polymeric systems containing transition metal complexes have recently drawn much attention: polymeric light emitting diodes, solar energy conversion, non-linear optics (NLOs), photorefractive, chemical sensing, electrochromism and electrocatalysis are some of the applications envisaged [1]. The opto-electronic properties of these systems can be easily tuned, by varying the transition metal and its correlations with the delocalized electron system of the polymer, along with the variety of modern synthetic routes available [1]. Another important feature is the possibility of phosphorescence emission, which is expected to enlarge the quantum yield and lifetime of excitons in emitting devices. Many studies dealing with the subject have come out, including reviews [2,3]. Rare-earth complexes have very well defined light emission properties together with a very high internal efficiency [4]. In particular, europium seems a promising candidate, since this rare-earth element emits in the red (615 nm) [5], which is hard to find in organic emitting polymers. So far the vast majority of efforts have been devoted to the dispersion of europium complexes in polymeric matrices and were designed

in such a way that the matrix acts as an antenna to the ion: the ligand in the Eu complex absorbs light emitted from the polymer, undergoes intersystem crossing into a triplet state, and then transfers its energy to the  $\text{Eu}^{3+}$  ion in the center of the complex [6]. In order to transfer energy from a conjugated polymer to the ligands of a Eu complex by dipole coupling (Förster transfer), the emission spectrum of the polymer and the absorption spectrum of the ligand must overlap [7].

The most employed ligands belong to the class of the  $\beta$ -diketonate group, because they sensitize  $\text{Eu}^{3+}$  emission [8]. In several cases a sharp red emission in the 613–620 nm region was observed, sometimes along with the blue emission of the polymer [9] and in other more successful cases only the red dominated the spectrum [7], either in PL as in EL spectra.

However, some drawbacks of these approaches have still to be overcome, such as the tendency of the complexes to decompose in thin film vacuum deposition, the difficulty to achieve a good dispersion of the dopant in the matrix and the fact that very few polymers emit in the high energy blue region where most of the ligands absorb, usually in the range 350–375 nm. For this reason PVK has been used in several studies [10]. Another approach is to covalently bind the complex in the polymer backbone [11]. This has been done in a few cases, and the materials not only inherited the advantages of conjugated polymers such as processability, solubility, and fluent change transportability but also had the intrinsic

\* Corresponding author. Tel.: +55 41 3027 0650; fax: +55 41 3027 0650.

E-mail address: [leni@leniak.net](mailto:leni@leniak.net) (L.C. Akcelrud).



characteristics of europium complexes, such as high fluorescence efficiencies with sharp red emission, good stability, and long lifetime. Examples include the attachment of europium to the branching sites of a bipyridine containing copolymer [12,13].

Structures having the ion  $\text{Eu}^{3+}$  directly bound to the polymer chain have shown pure red photoluminescence in some cases [7], and in others the emission of the polymer backbone was seen along with red from the metal [14]. In all these cases, the overlap between the polymer emission and the ligand absorption was sought.

Some cases reporting the linking of the ion to a non-conjugated backbone have also come out [15–17] focusing on the photophysical properties without addressing electroluminescence.

In the present contribution we present the synthesis and a study of the emitting properties of a europium complexed copolymer of fluorene and bipyridine (which provides the loci for the metal insertion) without such overlap poly [(9,9'-dihexyl-9H-fluorene-2,7-diyl)-1,2-ethenediyl-3,5-bipyridine-1,2-ethenediyl] (LaPPS34Eu). Since the f orbitals involved in the emission cannot be directly excited the energy to the ion is coming exclusively from the ligand, affording an opportunity to explore what are the consequences in the emitting properties of the metal brought about by the polymer chain restraints (conformations), without photo-processes involved. For comparison the same structure without the complexation (LaPPS34), and a model compound simulating the complexed sites (LaPPS34M) were also prepared and are depicted in Fig. 1. A theoretical study was also undertaken for a better understanding of the phenomena involved in the complexation reaction and in the photophysical behavior of the polymer systems.

## 2. Experimental

### 2.1. Materials

Fluorene (Acros, 98%), hexyl bromide (Aldrich, 98%), paraformaldehyde (Acros, 96%), triphenylphosphine (Vetec, P.A.), 2,2'-bipyridine-4,4'-dicarboxaldehyde (Aldrich, 95%), potassium t-butoxide (Acros, P.A.), hydrobromic acid solution in acetic acid (Acros, 33%), methylene chloride (Vetec, P.A.), ethyl ether (Vetec, P.A.), ethanol (Synth, 99.5%), methanol (Vetec, P.A.), chloroform (Vetec, P.A.), and n-hexane (Vetec, P.A.) were treated as described in the literature [18]. The TMS used as internal standard for the NMR analyses was Sigma–Aldrich, P.A., containing 1% (v/v) TMS. The chromatographic plates used to follow the dialkylation and bromomethylation of fluorene by TLC with dimensions of 2 cm × 7 cm, were prepared with silica gel 60 (Sigma–Aldrich). For the purifications a medium pressure chromatographic column, with silica as stationary phase, from Merck 230–400 mesh, was used.

### 2.2. Equipment

The molar masses of the copolymers were measured by an Agilent 1100 gel permeation chromatograph equipped with a refractive index and UV–Vis detector and gel mixed C and B columns in series, at 35 °C, using THF as solvent and monodisperse polystyrene samples as standards.

$^1\text{H}$  NMR and  $^{13}\text{C}$  NMR spectra were recorded in chloroform on a Bruker Advance at 200 MHz.

$^{13}\text{C}$  NMR spectra of the polymer were recorded in solid state on an INOVA VARIAN at 400 MHz.

The thermal decomposition temperature of the materials was determined by a Netzsch Analyser model TG 209. For the thermogravimetric tests (TGA) a heating rate of 20 °C/min was used with a nitrogen flow of 15 mL/min from room temperature to 450 °C. The DSC equipment used was a Netzsch DSC 204 F1. All samples were

heated from 20 to 250 °C at a rate of 10 °C/min in nitrogen atmosphere, then cooled down to 20 °C at 10 °C/min. This procedure was repeated and the second run was recorded.

The UV–Vis spectra were taken in a Shimadzu model NIR 3101 spectrophotometer. Steady-state fluorescence spectroscopy was performed on Shimadzu model RF5301-PC spectrophotometer, using a square cuvette of 1 cm. The spectral range was 300–550 nm for the excitation spectra and from 400 to 700 nm for emission spectra. Slits were selected for a spectral resolution of  $\pm 1$  nm in excitation and emission modes. For the solid state measurements the films were spin coated in a quartz substrate at a speed of 800 rpm for 1 min under nitrogen atmosphere, THF was used as solvent.

A potentiostat/galvanostat PAR model 273A was used for the electrochemical characterization, with a three electrode cell. A working electrode (Pt), pseudo-reference electrode (Pt), counter electrode (Pt), supporting electrolyte (0.1 M tetrabutyl ammonium hexafluorophosphate in acetonitrile) were used in the measurements with a scanning rate of 50 mV/s. The pair ferrocene–ferrocenium was used as internal standard.

The XPS spectra were collected on a VG Microtech ESCA3000 system using  $\text{Al K}_\alpha$  X-rays. The system has a 250 mm semi-hemispherical analyzer with 9 channeltron detectors. The ultimate vacuum of the machine is of  $3 \times 10^{-10}$  mbar and the overall resolution is of 0.8 eV. Survey and high resolution spectra were obtained with, respectively, 50 eV and 20 eV bandpass energy. The quantification of the elements on the sample surface was done using the proprietary system software. The deconvolution of the high resolution spectra was done using XPS International [19] Software. The Shirley method was used for the background subtraction of the spectra. The  $\text{C}_{1s}$  line for C–C/C–H bonds at 285 eV was used for all spectra binding energy corrections [20].

### 2.3. Chemical procedures

#### 2.3.1. Synthesis of 9,9'-di-n-hexylfluorene [21]

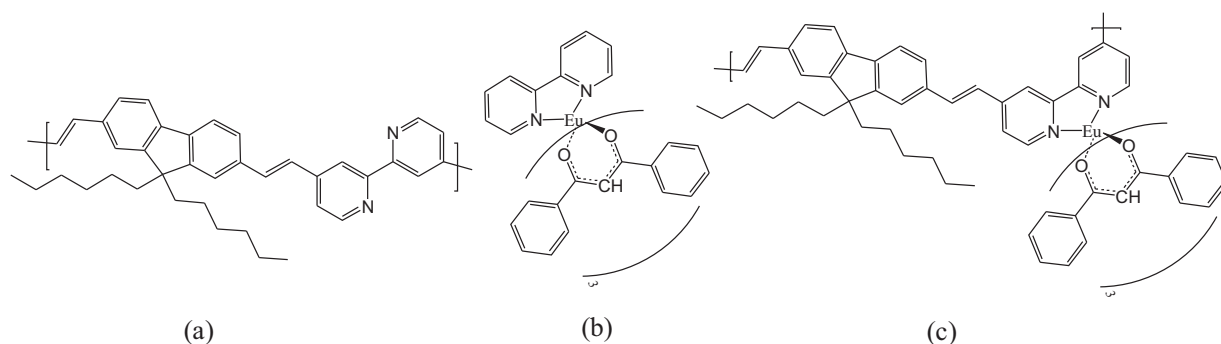
Fluorene, 10.20 g (61.4 mmol), and THF, 150 mL, were added to a three necked round bottom flask. The flask was deposited in an acetone/dry ice bath ( $T \approx -80$  °C) and 76 mL of n-BuLi (189.4 mmol) was added dropwise. After 2 h under stirring, 21.6 mL (150 mmol) of hexyl bromide was added. The cooling bath was removed after 10 min and the reaction proceeded under stirring for 24 h. After that the product was extracted with ethyl ether and washed with water, saturated NaCl water solution, and dried with anhydrous  $\text{MgSO}_4$ . The product was purified by distillation to remove unreacted hexyl bromide, and after that by column chromatography, and collected as colorless oil, with a yield of 19.05 g (57.02 mmol), 92.98%.

$^1\text{H}$  NMR ( $\text{CDCl}_3$ , 200 MHz):  $\delta$  (ppm) 7.67–7.72 (m, 2H); 7.25–7.38 (m, 6H); 1.90–1.99 (m, 4H); 0.94–1.18 (m, 12H); 0.75 (distorted triplet, 6H); 0.52–0.67 (m, 4H).

$^{13}\text{C}$  NMR ( $\text{CDCl}_3$ , 200 MHz):  $\delta$  (ppm) 150.65, 141.08, 126.93, 126.64, 122.80, 119.59, 54.98, 40.39, 31.48, 29.71, 23.70, 22.56, 13.98.

#### 2.3.2. Synthesis of 2,7-bis(bromomethyl)-9,9'-di-n-hexylfluorene [21]

To a three neck round bottom flask 12 g (35.9 mmol) of 9,9'-dihexylfluorene (1) and 12.28 g (391 mmol) of paraformaldehyde were added under argon atmosphere. 74.52 (344 mmol) HBr 33% in acetic acid solution were then added dropwise, and the reaction proceeded for 24 h at 60 °C. After that the mixture was cooled and water was added. The product was extracted with  $\text{CHCl}_3$ , washed with saturated  $\text{NaHCO}_3$  aqueous solution, water, saturated NaCl aqueous solution and dried with anhydrous  $\text{MgSO}_4$ . After solvent removal the product was purified in a chromatographic column and



**Fig. 1.** Structure of the: (a) LaPPS34 [poly(9,9'-dihexylfluorene-diyl-alt-3,5-bipyridinevinylene)], (b) LaPPS34M [Eu(dbm)<sub>3</sub>bipy], and (c) LaPPS34Eu poly[(9,9'-dihexylfluorene-diyl-alt-3,5-bipyridinevinylene) complexed with europium].

collected as a pale yellow oil, with a yield of 15.5 g (29.83 mmol), 83%.

<sup>1</sup>H NMR (CDCl<sub>3</sub>, 200 MHz):  $\delta$  (ppm) 7.65–7.61 (d, 2H); 7.40–7.25 (d, 4H); 4.60 (s, 4H); 1.94 (t, 4H); 1.26–0.87 (m, 16H); 0.76 (t, 6H).

$\delta$  (ppm) 7.61–7.66 (m, 2H); 7.26–7.45 (m, 6H); 4.60 (s, 4H); 1.90–1.98 (m, 4H); 0.95–1.15 (m, 12H); 0.76 (distorted triplet, 6H); 0.53–0.67 (m, 4H).

<sup>13</sup>C NMR (CDCl<sub>3</sub>, 200 MHz):  $\delta$  (ppm) 151.66, 140.74, 136.89, 127.99, 123.65, 120.04, 55.14, 40.07, 34.41, 31.35, 29.53, 23.64, 22.47, 13.97.

### 2.3.3. Synthesis of 2,7-bis[(p-triphenylphosphonium)methyl]-9,9'-di-n-hexylfluorene dibromide [21]

To a three necked round bottom flask 8.23 g (15.84 mmol) 2,7-bis(bromomethyl)-9,9'-dihexylfluorene (2) and 95 mL of dimethylformamide were added. Under argon atmosphere, 12.59 g (48 mmol) triphenylphosphine was then added and the mixture was kept under stirring at 110 °C for 24 h. After that it was allowed to cool to room temperature, and 50 mL water was added. The compound was precipitated with ethyl ether and washed several times with water. It was re-precipitated using CHCl<sub>3</sub>/hexane, as a white powder in 14.3 g (13.68 mmol), 86.39%.

<sup>1</sup>H NMR (CDCl<sub>3</sub>, 200 MHz):  $\delta$  (ppm) 7.61–7.80 (m, 30H); 7.34–7.38 (d,  $J$  = 7.88 Hz, 2H) 7.05–7.09 (d,  $J$  = 7.75 Hz, 2H); 6.95 (s, 2H); 5.44–5.37 (d,  $J$  = 14.23 Hz, 4H); 1.43–1.51 (m, 4H); 0.68–1.19 (m, 22H).

<sup>13</sup>C NMR (CDCl<sub>3</sub>, 200 MHz):  $\delta$  (ppm) 151.32, 140.49, 135.07, 134.34, 130.83, 130.12, 126.15, 125.38, 120.46, 118.25, 117.40, 117.23, 54.96, 39.97, 31.74, 31.26, 29.66, 23.91, 22.72.

### 2.3.4. Synthesis of poly [(9,9'-dihexyl-9H-fluorene-2,7-diyl)-1,2-ethenediyl-3,5-bipyridine-1,2-ethenediyl] (LaPPS34)

LaPPS34 was synthesized by the Wittig route, following the procedure described in Ref. [21].

To a one neck round bottom flask 2.0612 g (1.97 mmol) 2,7-bis[(p-triphenylphosphonium)methyl]-9,9'-di-n-hexylfluorene dibromide (3) and 0.418 g (1.97 mmol) of 2,2' bipyridine-4,4'-dicarboxaldehyde were dissolved in 30 mL chloroform, under argon atmosphere. 15 mL of an ethanol solution of potassium t-butoxide 1.1071 g (9.87 mmol, 2.5 eq) were added dropwise at room temperature. The polymer was re-precipitated with methanol. Impurities and oligomers were eliminated by Soxhlet extraction using methanol and then acetone. The polymer was filtered and dried under vacuum for 48 h, resulting in 0.49 g of product with a yield of the 46.2%.

<sup>13</sup>C NMR (CPMAS, 400 MHz):  $\delta$  (ppm) 154.50, 149.44, 143.22, 139.33, 133.49, 120.26, 52.96, 38.56, 28.45, 21.05, 12.10.

### 2.3.5. Synthesis of LaPPS34 complexed with europium (LaPPS34Eu)

LaPPS34Eu was synthesized following the procedure described in Ref. [22].

Polymer LaPPS34 (0.132 g, 0.245 mmol), dibenzoylmethane (DBM) (0.165 g, 0.735 mmol) and triethylamine (0.125 g, 1.235 mmol) were dissolved in dried THF (15 mL) under argon. Europium(III) chloride hexahydrate (0.0898 g, 0.245 mmol) was dissolved in methanol (3 mL) and added dropwise to the solution. After stirring for 24 h at 50 °C, the solvent was removed under reduced pressure. The yellow solid was filtered in a Buchner funnel and washed with methanol.

<sup>13</sup>C NMR (CDCl<sub>3</sub>, 200 MHz):  $\delta$  (ppm) 185.78, 172.98, 152.02, 135.08, 132.45, 130.82, 128.69, 127.17, 124.70, 93.16, 63.55, 40.10, 31.60, 29.69, 23.91, 22.64, 14.05.

### 2.3.6. Synthesis of model compound (LaPPS34M)

LaPPS34M was synthesized following the procedure described in Ref. [22].

2,2'-Bipyridyl (Bipy) (0.0382 g, 0.245 mmol), dibenzoylmethane (DBM) (0.165 g, 0.735 mmol) and triethylamine (0.125 g, 1.235 mmol) were dissolved in dried THF (15 mL) under argon. Europium(III) chloride hexahydrate (0.0898 g, 0.245 mmol) was dissolved in methanol (3 mL) and added dropwise to the solution. After stirring for 24 h at 50 °C, the solvent was removed under reduced pressure. The orange solid was filtered in a Buchner funnel and washed with methanol.

<sup>13</sup>C NMR (CDCl<sub>3</sub>, 200 MHz):  $\delta$  (ppm) 172.53, 130.96, 128.73, 127.17, 124.71, 93.12, 59.62, 45.99.

## 3. Theoretical

### 3.1. Computational methods

In order to determine the structure of the LaPPS34 polymer, we followed a sequence of steps involving quantum mechanical calculations, based on *ab initio* methods. Initially we optimized the geometry of the single LaPPS34 (non complexed polymer) molecule with the DFT method, using Becke, Three-Parameter, Lee–Yang–Parr functional (B3LYP) [23]. This functional was chosen because it is a hybrid of exact (Hartree–Fock) exchange with local and gradient-corrected exchange and correlation terms, used in calculations of very large molecules [24]. To describe the wave function we used a set of Gaussian split-based valence basis [25]. For the purposes of reliability in the calculations, we previously calculated the monomer structure, using the basic Gaussian Split-Valence 3-21G basis and later the 6-31G basis. The optimization done with the 6-31G basis was significantly different from the 6-31G(d,p) basis. All the computational results discussed in this study

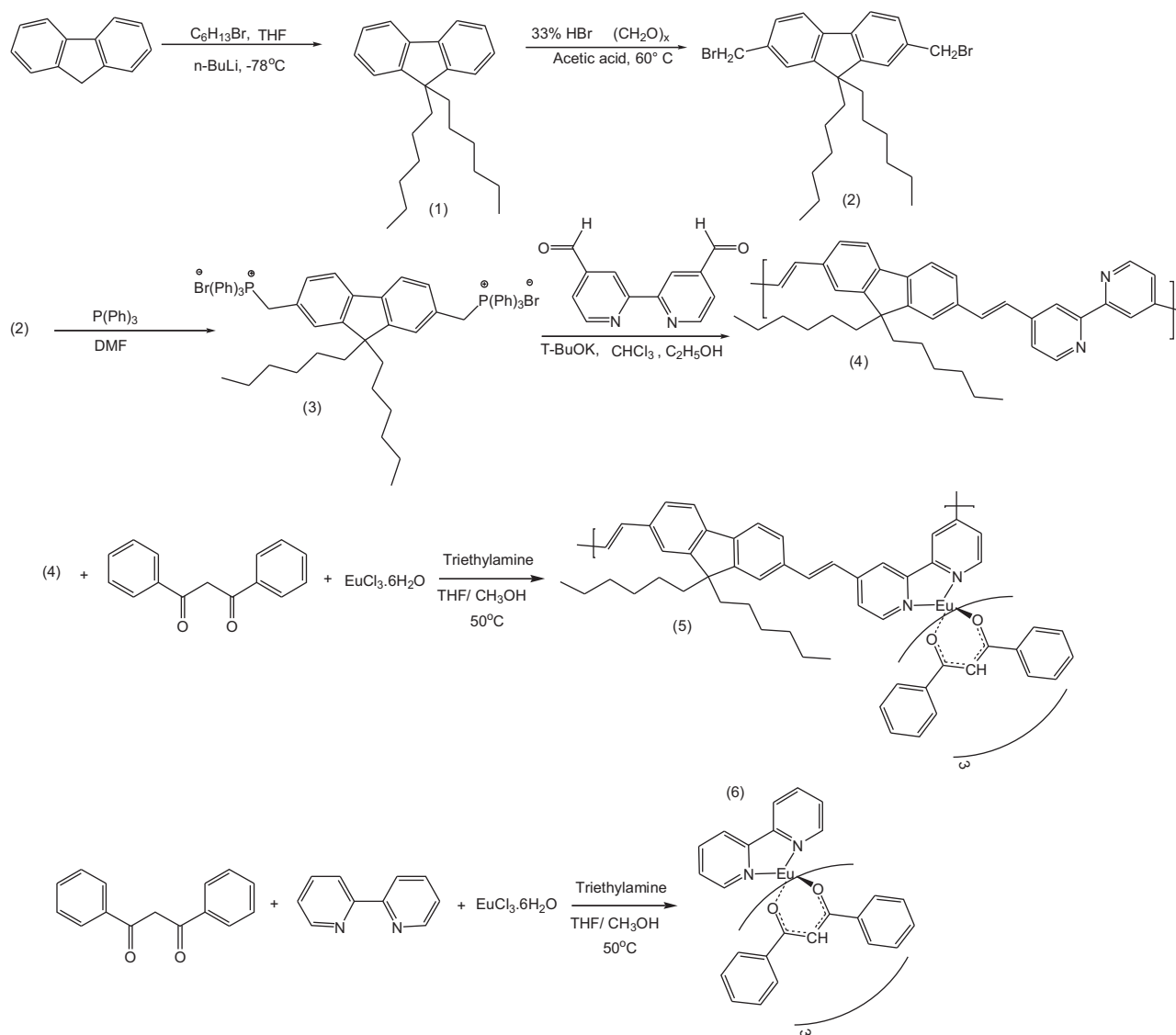


Fig. 2. Chemical route for the synthesis of LAPPS34 (4), LaPPS34Eu (5) and LaPPS34M (6).

were obtained performing calculations with the 6-31G(d,p) basis set. These simulations were performed using GAUSSIAN 09 [25] program.

The determination of the LaPPS34 absorption spectrum was made by using time-dependent ZINDO/S (Zerner's Intermediate Neglect of Differential Overlap/Single) [25] running under GAUSSIAN 09 program. The ZINDO/S transition energies were weighted by the oscillator strength values.

#### 4. Device preparation

Poly(3,4-ethylenedioxythiophene)/poly(styrenesulfonate) (PEDOT: PSS) films (Bayer Corporation) were deposited by spin-coating onto a patterned ITO/glass substrate (OFC Corporation,  $20 \Omega sq^{-1}$ ) and dried at  $200^\circ C$  for 10 min. A THF polymer solution ( $18 mg mL^{-1}$ ) was filtered and deposited by spin-coating at 2000 rpm over the PEDOT:PSS layer, under dry nitrogen environment. The polymer films were typically 100 nm thick. A metallic calcium layer (20 nm thickness) was deposited on top of the polymer layer by sublimation at  $10^{-6}$  mbar, followed by a protective layer of aluminum on top (120 nm thickness). The

final configuration of the device was ITO/PEDOT:PSS/polymer layer/Ca/Al.

#### 5. Results and discussion

##### 5.1. Structural characterization

Poly[(9,9-dihexyl-9H-fluorene-2,7-diyl)-1,2-ethenediyl-4,4'-bipyridine-1,2-ethenediyl] (LaPPS34) was synthesized following the Wittig route, shown in Fig. 2. The molar mass was  $M_w = 36,100 g mol^{-1}$  with polydispersity (PDI) 1.75. The polymer showed good solubility in organic solvents such as  $CHCl_3$ , THF, dichloromethane, among others, producing homogeneous and continuous films. The chemical structure was confirmed by  $^{13}C$ NMR, with the assignments shown in Section 2. TGA data showed that LAPPS34 is thermally stable ( $Td_{5\%}$ ) until  $368^\circ C$  in nitrogen atmosphere. When the polymer was complexed with  $Eu^{3+}$  (LaPPS34Eu), the thermal decomposition starts at  $284^\circ C$ , due the loss of the ligands. For the model compound, the decomposition starts at  $194^\circ C$  ( $Td_{5\%}$ ). The bound europium content was determined by TGA as 80%, using the model compound as a basis,

**Table 1**  
Binding energy of C<sub>1s</sub>, N<sub>1s</sub>, O<sub>1s</sub> and Eu3d<sub>5/2</sub>, in the polymers.

| Sample                         | C (1s)/eV | O (1s)/eV | N (1s)/eV |             | Eu (3d <sub>5/2</sub> )/eV |
|--------------------------------|-----------|-----------|-----------|-------------|----------------------------|
|                                |           |           | Free      | Coordinated |                            |
| LaPPS34                        | 285.00    | –         | 400.11    | –           | –                          |
| LaPPS34M                       | 285.00    | 534.91    | –         | 399.60      | 1135.50                    |
| LaPPS34Eu                      | 285.00    | 534.74    | 400.11    | 399.30      | 1136.17                    |
| EuCl <sub>3</sub> <sup>a</sup> |           |           |           |             | 1137.00                    |

<sup>a</sup> Ref. [26].

meaning that in every 100 polymer units, 80 were complexed with the ion.

The glass transition temperature (T<sub>g</sub>) was measured by DSC as 126 °C for LaPPS34 (non complexed polymer) and 176 °C for LaPPS34Eu (complexed polymer). The insertion of the ion rendered the polymer backbone more rigid, since the bulkiness of the complexed site requires a higher energy for rotation.

The HOMO and LUMO energy levels of the LaPPS34 were determined by cyclic voltammetry and UV–Vis spectroscopy. Using the energy correction for the ferrocenium/ferrocene electrode as internal standard, the values for HOMO and the LUMO levels were determined as –6.11 and –3.20 eV, respectively. In the electrochemical measurements it was verified that the n doping of the LaPPS34 is an irreversible process, since no reduction reaction associated to the doping was observed. The LaPPS34Eu showed the same electrochemical behavior of LaPPS34 but the europium redox process could not be observed. It is possible that the oxidation process of the polymer (E<sub>onset</sub> = 1.41 V) brings about the rupture of the vinylene linkage, starting a possible “crosslinking” of the polymer or any other mechanism.

The complexed content was determined from two different data: from the Eu<sub>2</sub>O<sub>3</sub> residue in TGA and by XPS. Both gave an average value of 80%. The weight of the TGA residue converted to molar basis will give the amount of the ion in the polymer sample. The accuracy of this procedure was confirmed using the model compound whose molecular weight is known.

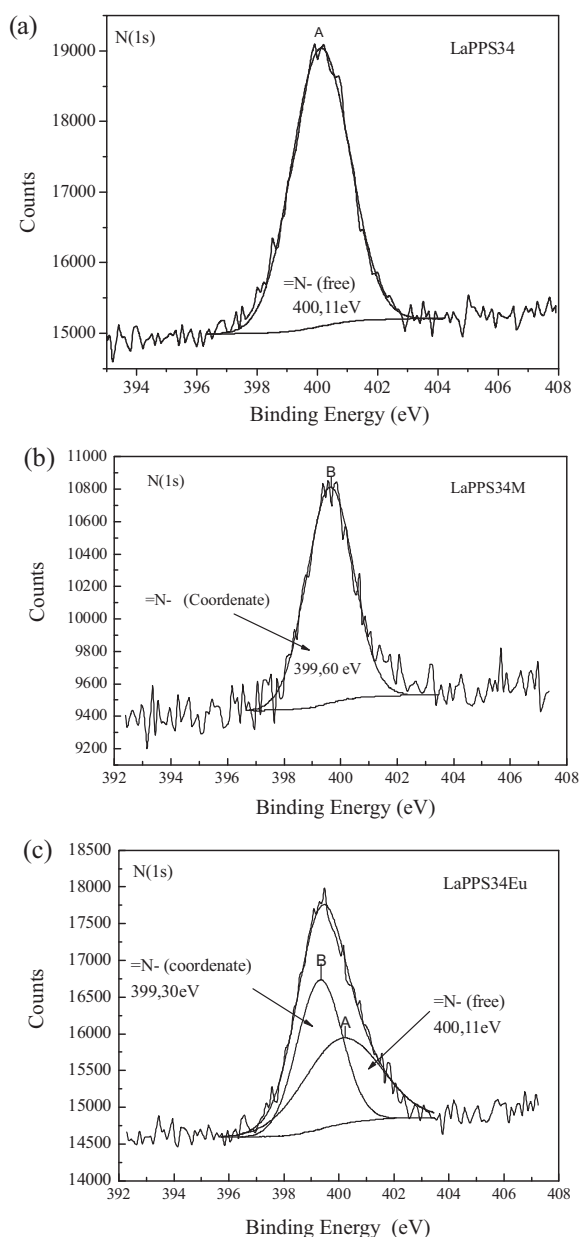
The XPS spectra are shown in Fig. 3(a–c), and the data compiled in Table 1. The bonding energy of the 1s orbital for the free nitrogen atoms of bipyridine (=N–) in the non-complexed polymer LaPPS34 is 400.11 eV (a); for the complexed nitrogen atoms in the model compound LaPPS34M is 399.18 eV (b). The complexed polymer LaPPS34Eu showed the presence of nitrogen atoms in both different chemical environments, that is, one related to the free atom and the other to the complexed one, showing that the complexation was not complete. The coiled shape of the chain should be responsible for the partial complexation, since some bipyridine sites might be not accessible to reaction with the europium salt.

The amount of Eu<sup>3+</sup> incorporation (80%, molar basis) was used to determine the molecular weight of LaPPS34Eu from that of precursor, LaPPS34: (M<sub>w</sub> noncomplexed unit)(20) + (M<sub>w</sub> complexed unit)(80) = 80,332 g mol<sup>–1</sup>.

Differences in the bonding energy between free and complexed nitrogen atoms have been accounted to the energy transfer from the metal to the ligand (or vice versa) [26]. In principle, the decrease in the bonding energies in the LaPPS34 as compared to those of Eu3d<sub>5/2</sub> and N<sub>1s</sub>, as shown in Table 1, could be taken as an indication of the increase in the electronic density on the nitrogen atoms of the complexed LaPPS34Eu.

## 5.2. Theoretical studies

Optimization geometry calculations were initially performed and the values for the HOMO and LUMO were obtained for oligomers with 1, 2 and 4 mers, using the same functional and the same wavefunction basis set. The transition HOMO–LUMO energy

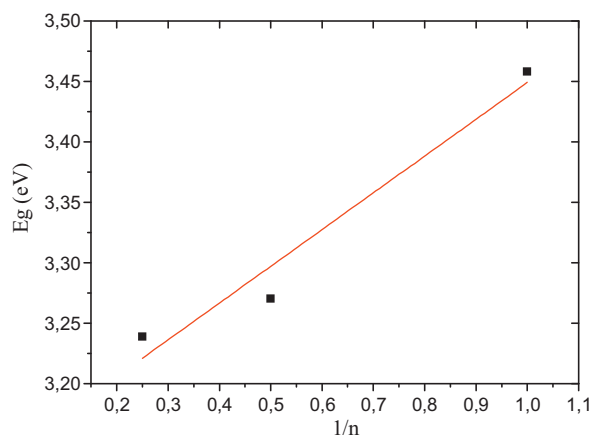


**Fig. 3.** XPS spectra of the N<sub>1s</sub> signal for LaPPS 34 (a); LaPPS 34M (b) and LaPPS 34Eu (c).

vs  $1/n$ , where  $n$  is the number of repeating units used at the calculation, gives, by linear extrapolation, this transition energy to a long polymer chain (large  $n$  value). The point intercepting the origin represents this property of a polymer with a degree of polymerization of infinity. The theoretical result, 3.14 eV, is very close to the experimental one, 2.91 eV. The experimental data about the HOMO–LUMO transition were used as a reference to theoretically determine how many LaPPS34 units were necessary to reach convergent energy results for the polymer. This is presented in Fig. 4.

In order to clarify the conformational state of the non-complexed polymer, the geometry optimization of the tetramer was carried out to find the states of same energy. The results are shown in Fig. 5, and the comparison with those obtained experimentally by XPS, are depicted in Fig. 6.

In the optimized structure, the polymer chain looks very planar and such behavior was expected due to the large  $\pi$  character of the structure. Another observation is that the dihedral angle NCCN, in all repeating units in the polymer has almost the same angle of

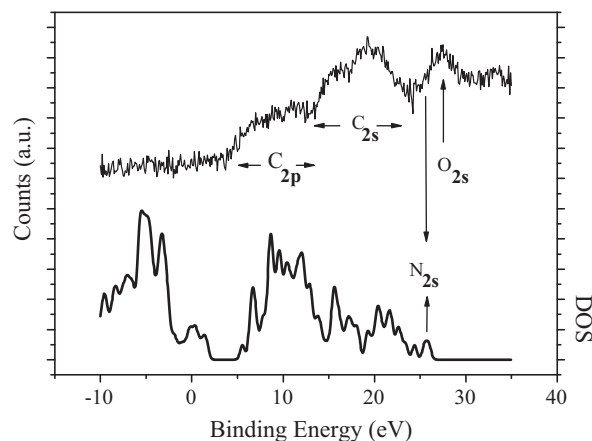


**Fig. 4.** Calculated energy gap ( $E_g$ ) vs  $1/n$ ;  $n$  is the number of repeating units.

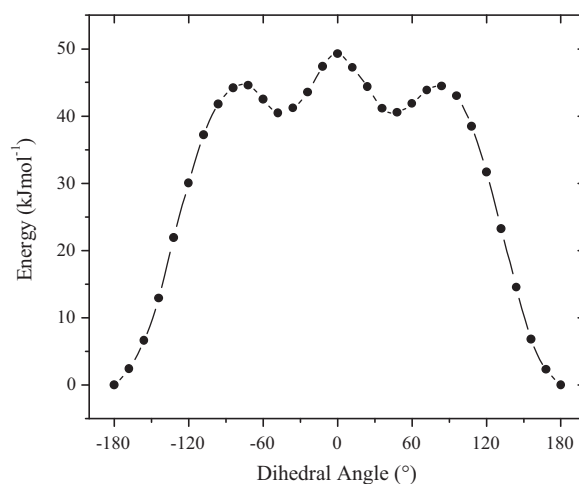
$179^\circ$ , as shown in the potential energy diagram in Fig. 7. This fact is justified by repulsion between the lone pairs on each nitrogen atom hybridized in  $sp^2$ , forcing the rotation of one pyridine unit to minimize the energy, thus reaching a maximum angle of departure of nearly  $180^\circ$ . Along with the coiled shape of the polymer, hindering the access of the europium salt to all potential sites of complexation, the twisted configuration of the bipyridine unit is a major factor for incomplete europium complexation to all bipyridine moieties. The insertion of the metal would require a deformation of the unit to a dihedral angle from  $179^\circ$  to near  $0^\circ$ .

In order to evaluate the amount of energy involved in the rotation of the dihedral angle, we calculated the potential energy surface (PES) involved in the rotation of one of the NCCN dihedral angles which was varied from  $0^\circ$  to  $360^\circ$  using the SCAN software tool. The results are graphically shown in Fig. 7.

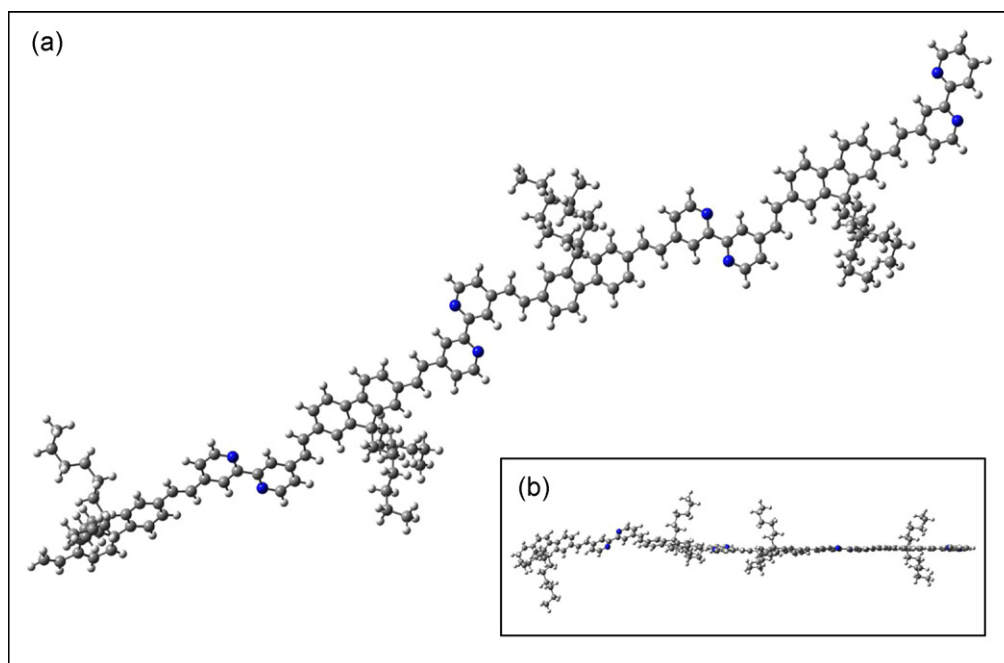
The obtained data showed that the energy barrier to be overcome is approximately  $49 \text{ kJ mol}^{-1}$ . A more detailed analysis about the dihedral angle was made by Göller and Grummt analyzing this angle for the isolated bipyridine, who found very similar results [27].



**Fig. 6.** Valence band spectrum of the LaPPS34 polymer obtained by XPS compared to the density of states of the theoretical simulation.

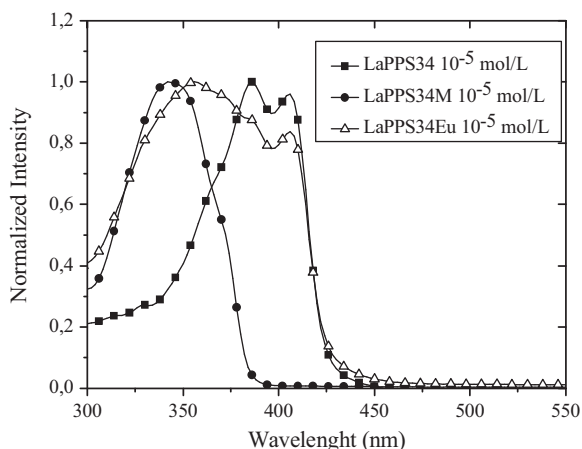


**Fig. 7.** Potential energy diagram of the dihedral angle N–C–C–N in the central polymer position, obtained by SCAN.



**Fig. 5.** (a) Theoretical optimized geometry of LaPPS34 polymer, (b) planar geometry detail.





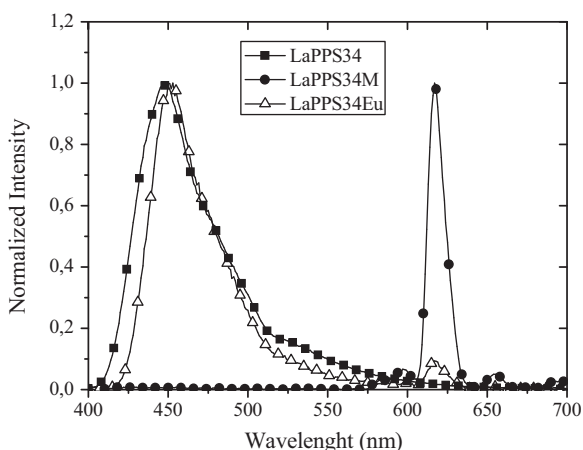
**Fig. 8.** Normalized absorption spectra of LaPPS34, LaPPS34M and LaPPS34Eu in THF solutions ( $10^{-5}$  mol/L).

### 5.3. Photophysical properties

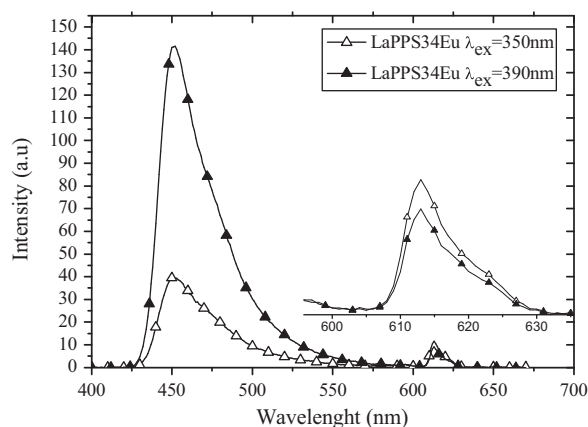
#### 5.3.1. Measurements in solution

The absorption and emission spectra of the LaPPS34 (non complexed), LaPPS34Eu (complexed) and LaPPS34M (model compound) are depicted in Figs. 8 and 9, respectively. It is clearly seen that the complexed polymer (LaPPS 34Eu) absorption spectrum (Fig. 8) contains both absorption regions relative to the ligands (LaPPS34M, around 350 nm) and to the polymer backbone (LaPPS34, in the 400 nm region) with a typical profile of polyfluorenes. The emission spectrum (Fig. 9) of the model compound shows a complete energy transfer from the ligands to the ion, which emits sharply at 620 nm. The complexed polymer emits in both blue and red regions, whereas the non complexed depicts the backbone emission only, as expected.

The spectra in Fig. 10 indicate that in the LaPPS34Eu two independent systems coexist: the complexed and the non complexed repeating units in the same polymer chain. Exciting with wavelength in the polymer absorption region (390 nm) or in the ligand absorption region, the europium peak at 615 nm does not suffer any intensity alteration, indicating that no energy transfer from the polymer backbone (polyfluorene) to the metal is occurring. The photophysical behavior of the polymers relative to concentration is shown in Fig. 11(a and b). It is observed that in dilute conditions the polymers display an absorption profile typical of polyfluorenes [28,29] and that the emission follows a progressive bathochromic



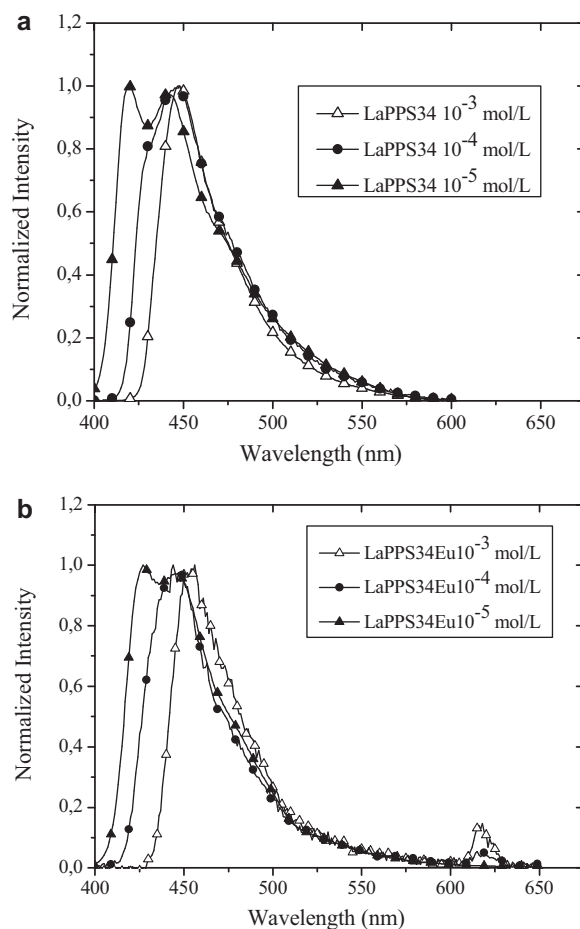
**Fig. 9.** Normalized emission spectra of LaPPS34 ( $\lambda_{\text{exc}} = 390$  nm), LaPPS34M ( $\lambda_{\text{exc}} = 350$  nm) and LaPPS34Eu ( $\lambda_{\text{exc}} = 350$  nm) in THF solutions ( $10^{-3}$  mol/L).



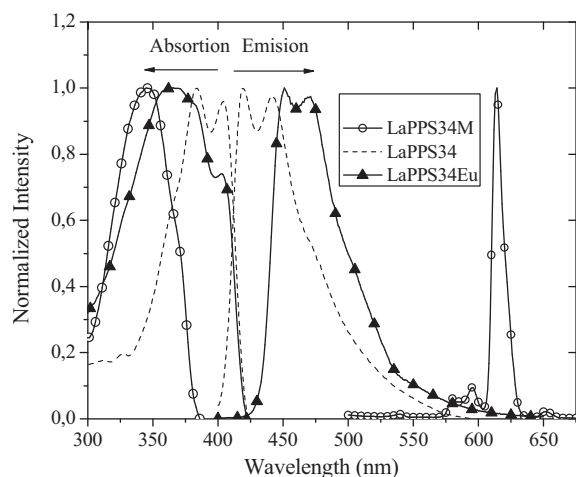
**Fig. 10.** Emission spectra of LaPPS34Eu in THF solutions ( $10^{-3}$  mol/L) with different wavelength excitations.

shift with concentration. The first band at 420 nm disappears in the more concentrated conditions, indicating the occurrence of inner filter and/or energy transfer processes from the isolated to emissive aggregated species, formed either in the electronic ground state or excimers [30,31].

To facilitate the comparison among the spectra of the three materials involved, their absorption and emission spectra are put together in Fig. 12. The spectral profile of the model compound agrees with those reported for europium complexes [7],



**Fig. 11.** Emission spectra of LaPPS34 (a) and of LaPPS 34Eu (b). THF solutions of various concentrations were used.  $\lambda_{\text{exc}} = 390$  nm (LaPPS34) and  $\lambda_{\text{exc}} = 350$  nm (LaPPS34Eu).

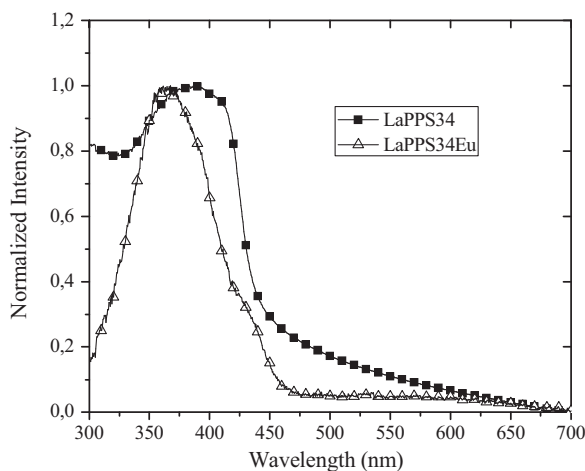


**Fig. 12.** Absorption and emission spectra of the three materials: complexed and non-complexed polymer and model compound.  $10^{-5}$  mol/L solution in THF.

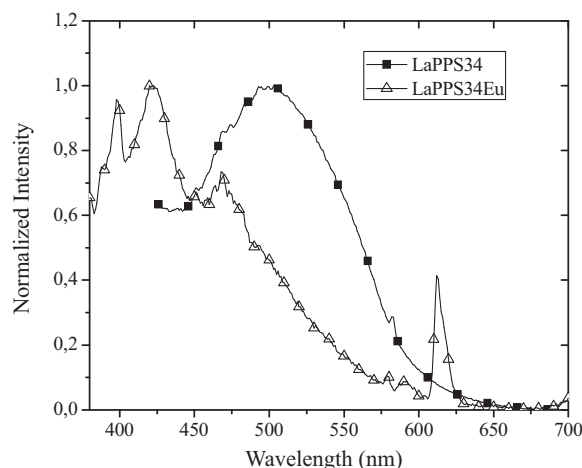
absorbing at 350 nm and emitting at 613 nm. The 0,0 band for LaPPS34 does not show a significant Stokes shift, but a small spectral overlap between absorption and emission indicate that self absorption can occur in this system. The fact that its absorption and emission are practically mirror images also points out to the absence of conformational changes or energy migration in the excited state [32,33]. The complexed polymer presented no such spectra overlap, ruling out self absorption. The peak at 613 nm was not seen in this concentration ( $10^{-5}$  M), since it was only detectable above  $10^{-4}$  M (Fig. 11(b)). Since no spectral overlap between the absorption of the model compound LaPPS34M and the emission of the polymer backbone LaPPS34, the Forster energy transfer was not operating.

### 5.3.2. Measurements in the solid state

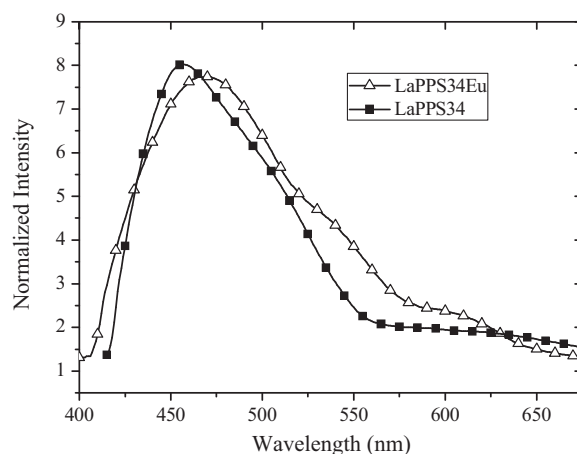
In film form the absorption spectra of the polymers no longer display their vibronic structure, indicating a conformational disorder that was frozen during the fast solvent evaporation. At the same time, the bands position was maintained, as shown in Fig. 13. The emission spectra of the non complexed LaPPS34 also revealed a conformational disorder in broad bands red shifted in relation to the solution spectra typical of aggregated species emission [28,29]. Care was taken to assure that the films had as possible the same thickness. The striking effect brought about by the insertion of the Eu in the chain was the recovery of the vibronic structure and a



**Fig. 13.** Absorption spectra of the polymers in film form.



**Fig. 14.** Emission spectra of the films in film form.  $\lambda_{exc} = 350$  nm for LaPPS34Eu and  $\lambda_{exc} = 400$  nm for LaPPS34.

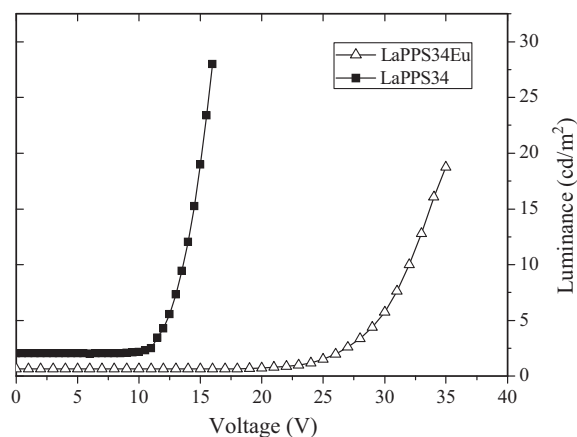


**Fig. 15.** Electroluminescence spectra of LaPPS34 and LaPPS34Eu.

clear fluorene emission, that is, the bulky metallic ion acted as a de-aggregating agent of the LaPPS34 system, as seen in Fig. 14.

### 5.3.3. Electroluminescence properties

Preliminary tests performed in EL devices showed that double emission occurred, with a similar profile of the photoluminescence, with both blue and red emission, coming from the polymer backbone and the europium ion, respectively, indicating that EL and PL



**Fig. 16.** Luminance vs voltage for LaPPS34 and LaPPS34Eu.

emission followed the same radiative pathways. The EL spectra are shown in Fig. 15, and the emission characteristics in Fig. 16. The significant increase in the turn-on voltage for the complexed polymer (20 V) as compared to the pure backbone (10.5 V) was taken as an indication that the ion site is probably acting as a charge trap, since the size of the europium atom allows it to accommodate charges without changing its electronic structure [34–36]. The maximum luminance was similarly affected: from 28 Cd/m<sup>2</sup> at 16 V for LaPPS34 to 19 Cd/m<sup>2</sup> at 35 V, for LaPPS34 Eu.

## 6. Conclusions

The insertion of the europium ion with DBM ligands onto a fluorene–bipyridine copolymer was achieved in 80% of the repeating units of the polymer, and required a twist of the second pyridine group of 179° to achieve the necessary planarity for the inclusion. The energy required for this transition is 49 kJ mol<sup>−1</sup>.

No electronic coupling between the main chain and the complexed sites occurred, but the insertion of the bulky DBM–Eu groups hindered the aggregate emission, as showed in the emission spectrum in film form of the complexed polymer, with a clear emission of isolated fluorene emission in the high energy region, as compared to the pure backbone, that showed only a red shifted broad profile. Preliminary electroluminescence studies showed that the EL and PL spectra are consistent, showing both emissions of the Eu and the polymer backbone. The complexation brought about a decrease in the electroluminescent properties, which was attributed to charge trapping by the europium ion.

## Acknowledgements

The authors wish to acknowledge INEO (National Institute for Organic Electronics) and CNPq (National Research Council) for financial support.

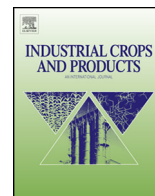
## Appendix A. Supplementary data

Supplementary data associated with this article can be found, in the online version, at doi:10.1016/j.synthmet.2011.11.005.

## References

- [1] L. Yao, L. Yiting, S. Kirk, *Journal of Photochemistry and Photobiology C: Photochemistry Reviews* 3 (2002) 1.
- [2] G.F. de Sá, O.L. Malta, C.M. Donegá, A.M. Simas, R.L. Longo, P.A. Santa-Cruz, E.F. da Silva, *Coordination Chemistry Reviews* 196 (2000) 165.
- [3] A.B. Dias, *Dalton Transactions* (2007) 2229.
- [4] J. Kido, Y. Okamoto, *Chemical Reviews* 102 (2002) 2357.
- [5] G. Santos, F.J. Fonseca, A.M. Andrade, V. Deichmann, L. Akcelrud, S.S. Braga, A.C. Coelho, I.S. Gonçalves, M. Peres, W. Simões, T. Monteiro, L. Pereira, *Journal of Non-Crystalline Solids* 354 (2008) 2897.
- [6] P.K. Kristensen, T.G. Pedersen, K. Zhu, D. Yu, *The European Physical Journal: Applied Physics* 37 (2007) 57.
- [7] M.D. McGehee, T. Bergstedt, C. Zhang, A.P. Saab, M.B. O'Regan, G.C. Bazan, V.I. Srdanov, A.J. Heeger, *Advanced Materials* 16 (1999) 11.
- [8] H.L. Handl, R.J. Gillies, *Life Sciences* 77 (2005) 361.
- [9] Y. Liu, J. Li, C. Li, J. Song, Y. Zhang, J. Peng, X. Wang, M. Zhu, Y. Cao, W. Zhu, *Chemical Physics Letters* 433 (2007) 331.
- [10] J. PENG, T. Noriyuki, M. Nobutsugu, *Thin Solid Films* 405 (2002) 224.
- [11] Q.D. Ling, E.T. Kang, K.G. Neoh, *Macromolecules* 36 (2003) 6995.
- [12] J. Pei, X.L. Liu, W.L. Yu, Y.H. Lai, Y.H. Niu, Y. Cao, *Macromolecules* 35 (2002) 7274.
- [13] Z. Lili, M. Qian, L. Yan, X. Jinqian, H. Xiaobo, C. Yixiang, *Chinese Journal of Chemistry* 27 (2009) 1179.
- [14] Z. Wang, D.W. Samuel, *Journal of Luminescence* 111 (2005) 199.
- [15] J. Kai, D.F. Parra, H.F. Brito, *Journal of Materials Chemistry* 18 (2008) 4549.
- [16] X. Gu, P. Xi, B. Cheng, S. Niu, *Polymer International* 59 (2010) 772.
- [17] C.J. Xu, B.G. Li, *Macromolecular Chemistry and Physics* 211 (2010) 1733.
- [18] D.D. Perrin, W.L. Armarego, *Purification of Laboratory Chemicals*, 3rd ed., Butterworths Heinemann, Oxford, 1988.
- [19] XPS International SDP V. 32.2; 754 Leona Lane, Mountain View, CA 94040, USA.
- [20] G. Beamson, D. Briggs, *High resolution XPS of Organic Polymers*, The Scienta ESCA300 Database, John Wiley, Chichester, 1992.
- [21] B. Nowacki, E. Iamazaki, A. Cirpan, F. Karasz, T.D.Z. Atvars, L. Akcelrud, *Polymer* 50 (2009) 6057.
- [22] J. Ritchie, A. Ruseckas, P. André, C. Münther, M.V. Ryssen, D.E. Vize, J.A. Crayston, D.W. Samuel, *Synthetic Metals* 159 (2009) 583.
- [23] C. Lee, W. Yang, R.G. Parr, *Physical Review B* 37 (1988) 785.
- [24] P.J. Stephens, F.J. Devlin, C.F. Chabalowski, M.J. Frisch, *The Journal of Physical Chemistry* 98 (1994) 11623.
- [25] M.J. Frisch, G.W. Trucks, H.B. Schlegel, G.E. Scuseria, M.A. Robb, J.R. Cheeseman, J.A. Montgomery, T. Vreven, K.N. Kudin, J.C. Burant, J.M. Millam, S.S. Iyengar, J. Tomasi, V. Barone, B. Mennucci, M. Cossi, G. Scalmani, N. Rega, G.A. Petersson, H. Nakatsuji, M. Hada, M. Ehara, K. Toyota, R. Fukuda, J. Hasegawa, M. Ishida, T. Nakajima, Y. Honda, O. Kitao, H. Nakai, M. Klene, X. Li, J.E. Knox, H.P. Hratchian, J.B. Cross, C. Adamo, J. Jaramillo, R. Gomperts, R.E. Stratmann, O. Yazyev, A.J. Austin, R. Cammi, C. Pomelli, J.W. Ochterski, P.Y. Ayala, K. Morokuma, G.A. Voth, P. Salvador, J.J. Dannenberg, V.G. Zakrzewski, S. Dapprich, A.D. Daniels, M.C. Strain, O. Farkas, D.K. Malick, A.D. Rabuck, K. Raghavachari, J.B. Foresman, J.V. Ortiz, Q. Cui, A.G. Baboul, S. Clifford, J. Cioslowski, B.B. Stefanov, G. Liu, A. Liashenko, P. Piskorz, I. Komaromi, R.L. Martin, D.J. Fox, T. Keith, M.A. Al-Laham, C.Y. Peng, A. Nanayakkara, M. Challacombe, P.M.W. Gill, B. Johnson, W. Chen, M.W. Wong, C. Gonzalez, J.A. Pople, *Gaussian 03, Revision B.04*, Gaussian Inc., Pittsburgh, PA, 2003, [http://www.gaussian.com/g\\_misc/g03/citation\\_g03.htm](http://www.gaussian.com/g_misc/g03/citation_g03.htm).
- [26] L.H. Wang, W. Wang, W.G. Zhang, E.T. Kang, W. Huang, *Chemistry of Materials* 12 (2000) 2212.
- [27] A. Göller, U.W. Grummt, *Chemical Physics Letters* 321 (2000) 399.
- [28] L. Akcelrud, T.D.Z. Atvars, P.C. Rodrigues, P.M. Oliveira, T.D. Martins, *Journal of the Brazilian Chemical Society (Online)* 20 (2009) 160.
- [29] E.R. Simas, G.H. Marcelo, A. Glogauer, L.C. Akcelrud, *The Journal of Physical Chemistry A* 112 (2008) 5054.
- [30] R. Giro, M.J. Caldas, J.Y.A. Davila, A.M. Machado, L. Akcelrud, *International Journal of Quantum Chemistry* 110 (2010) 885.
- [31] A.M. Machado, J.D. Da Motta Neto, T.D.Z. Atvars, L. Akcelrud, *Journal of Luminescence* 129 (2009) 720.
- [32] W.C. Tsoi, A. Charas, A.J. Cadby, G. Khalil, A.M. Adawi, A. Iraqi, B. Hunt, J. Morgado, D.G. Lidzey, *Advanced Functional Materials* 18 (2008) 600.
- [33] R.F. Cossello, M.D. Susman, P.F. Aramendia, T.D.Z. Atvars, *Journal of Luminescence* 130 (2010) 415.
- [34] Z. Zhang, J. Yuan, H. Tang, H. Tang, L. Wang, K. Zhang, *Journal of Polymer Science: Part A: Polymer Chemistry* 47 (2009) 210.
- [35] H. Xu, R. Zhu, P. Zhao, W. Huang, *The Journal of Physical Chemistry C* 115 (2011) 15627.
- [36] H. Xu, R. Zhu, P. Zhao, L. Xie, W. Huang, *Polymer* 52 (2011) 804.





## Syngonanthus nitens: Why it looks like spun gold



L.S. Berlim<sup>a</sup>, H.A. Gonçalves<sup>a</sup>, V.S. de Oliveira<sup>a</sup>, N. Mattoso<sup>a</sup>, A.S. Prudente<sup>b</sup>,  
A.G. Bezerra Jr.<sup>c</sup>, W.H. Schreiner<sup>a,\*</sup>

<sup>a</sup> Departamento de Física, Universidade Federal do Paraná, Centro Politécnico, Jardim das Américas, 81531-980 Curitiba, Paraná, Brazil

<sup>b</sup> Departamento de Farmacologia, Universidade Federal do Paraná, Centro Politécnico, Jardim das Américas, 81531-980 Curitiba, Paraná, Brazil

<sup>c</sup> Departamento Acadêmico de Física, Universidade Tecnológica Federal do Paraná Avenida Sete de Setembro, 3165, Centro, 80230-010 Curitiba, Paraná, Brazil

### ARTICLE INFO

#### Article history:

Received 9 July 2013

Received in revised form 5 October 2013

Accepted 19 November 2013

#### Keywords:

*Syngonanthus nitens*

Flavonoids

Reflection

### ABSTRACT

We report on the optical properties of *Syngonanthus nitens*, the golden grass, which is used to produce golden handicraft articles. The dry stems of the plant were analyzed with scanning electron microscopy, X-ray photoelectron spectroscopy, fluorescence microscopy; angle resolved optical reflectance and absorption/emission spectroscopy. The extract of the stems composed by 8 glucopyranosylflavones was also optically characterized. Electronic and geometric properties of the flavonoids were studied using ab initio and semi-empirical quantum mechanical calculations. The experimental and theoretical results explain the characteristic golden color of *S. nitens* dried stems.

© 2013 Elsevier B.V. All rights reserved.

## 1. Introduction

*Syngonanthus nitens* (Bong.) Ruhland is native to central Brazil and is called the golden grass due to its flower stem or scape which shines like spun gold, as shown in Fig. 1. Despite being erroneously called a grass, *S. nitens* is one of the more than six thousand species of the *Eriocaulaceae* (Schmidt et al., 2007) family. The stems are collected, dried and used as an important handicraft element, to produce golden decorative items, acquiring economical value and representing a real income for rural communities in certain Brazilian regions. Furthermore the decorative objects are sold and exported worldwide as exotic handicraftsmanship.

Scientific reports on *S. nitens* are rare in the literature and mainly devoted to economical/ecological sustainability aspects, and so it is surprising that its golden color origin has not been investigated. Exactly this particular color is the driving force to produce wealth with this crop.

## 2. Materials and methods: experimental

We used commercially available decorative golden grass samples for this study. The stems were cut to adequate pieces for the different characterizations. The extracts were obtained suspending

the scapes in methyl alcohol or distilled water at room temperature and ultrasonication for 1 h.

SEM (Scanning Electron Microscopy) images of the scapes were obtained using a VEGA3 TESCAN operating at 30 kV. The 3D, roughness and waviness results were obtained using three scans (sample normal, +5° and −5°) of the same selected area employing ALICONA MeX software.

XPS (X-ray photoelectron spectroscopy) measurements were done using a VG Microtech ESCA 300 system with an Al X-ray anode, a 250 mm semi-hemispherical energy analyzer, 9 channeltron detectors and a base vacuum of  $3 \times 10^{-10}$  mbar. The energy resolution of the system was of 0.8 eV. Quantification of the elements on the sample surface was done using the systems proprietary software.

The fluorescence microscopy was done on an Olympus DX51 with detector DP72 using the following Olympus filters: U-MWU2, U-MWB2, U-MWG2, U-N31004, U-N31005, and U-M00050.

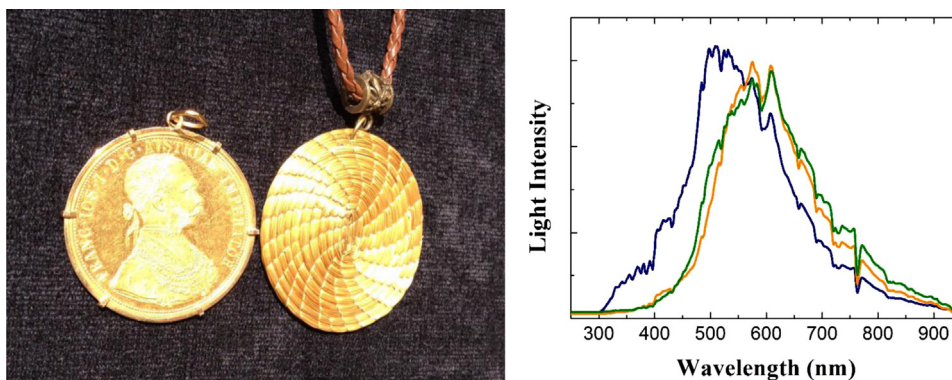
The UV–vis reflection spectra of the stems and the absorption/transmission spectra of the extract suspension were obtained with an Ocean Optics USB2000 spectrometer.

The fluorescence measurements were done on a Shimadzu spectrofluorophotometer model RF-5301 PC.

For the angle resolved reflectance measurements a home-made goniometer was used, employing RGB (Red Green Blue) laser diodes operating at 650, 532 and 405 nm, respectively, and the above mentioned Ocean Optics spectrometer. For these measurements the stems were fixed on a planar substrate with adhesive.

\* Corresponding author. Tel.: +55 41 33613427.

E-mail address: [wido@fisica.ufpr.br](mailto:wido@fisica.ufpr.br) (W.H. Schreiner).



**Fig. 1.** A comparison of the visual appearance of a gold coin and *S. nitens* handicraft. The resemblance of both objects is also shown by reflectance measurements of sunlight (right). The solar spectrum (blue line) was directly taken by an optical fiber attached to the spectrometer. Light reflection was collected at 45° for gold (yellow line) and *S. nitens* (green line).

### 3. Materials and methods: theoretical

Electronic and geometric properties of flavonoids were studied using *ab initio* quantum mechanical calculations. First, the geometry of each flavonoid was optimized with the DFT (Density Functional Theory) method using the Becke three-parameter, (Lee–Yang–Parr functional B3LYP, 1988) which is a hybrid functional of exact (Hartree–Fock) exchange with local and gradient-corrected exchanges and correlation terms used in calculations of very large molecules (Stephens et al., 1994). A set of Gaussian Split-based Valence wave function basis was used (Frisch et al., 2009). For purposes of reliability in the calculations, the geometry was previously optimized using the basic Gaussian split-valence (with double diffuse functions) 6-31G(d,p) basis, which gives good ground state geometries for conjugated polymers (Hsu et al., 2010; Lin et al., 2003). These simulations were performed using the GAUSSIAN 09 package (Frisch et al., 2009). DFT/B3LYP calculations with the 6-31G(d,p) basis set running GAUSSIAN 09 were performed.

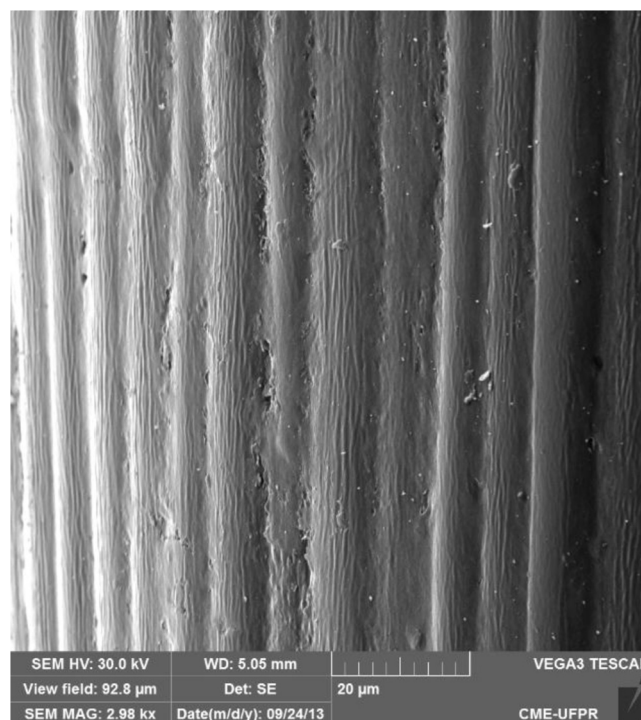
Finally, simulation of the optical absorption spectrum of flavonoid immersed in a methanol solution and water solution were performed using ZINDO (Zerner's intermediate neglect of differential overlap/single) (Frisch et al., 2009) running under the GAUSSIAN 09 program. The optical absorption spectra were calculated with PCM (Polarizable Continuum Model) (Frisch et al., 2009) using the integral equation formalism variant SCRF (Self-Consistent Reaction Field) solvation models, for 60 excited states. The ZINDO transition energies were weighted by the oscillator strength values.

### 4. Results

The first aspect studied for the characterization of *S. nitens* stems was their elemental surface composition. A quantification via XPS spectra led to C 86.6 at%, O 11.7 at% and with Si 1.7 at% as the single impurity. The high carbon content of at the surface is due to the epidermis of the stems (Scatena et al., 2004), which is composed mainly by cutin, waxes, C24 and C34 alkanes (Javelle et al., 2004).

Other elements, specifically metals, were not found (H is not measured by XPS), showing that the golden color is not due to some extraneous element or elements.

Recently (Siqueira et al., 2010), while trying to reinforce natural rubber with *S. nitens* fibers, determined the composition of the biological material which constitutes the golden scapes. They found that the stems are formed by 90% (w/w) holocellulose (67% cellulose and 27% hemicelluloses), 6.5% (w/w) lignin, 1.2% (w/w) ashes and 0.75% (w/w) extractives. The cellulose crystallinity index of the scales was found to be about 70.1%. Thus, the stems have high



**Fig. 2.** Scanning electron microscope image of the *S. nitens* stem surface. The surface is characterized by a micro/nano-structure which runs along the stem axis. The SEM magnification for this image was 2.98 kX.

cellulose content, almost as high as cotton lint (Satyanarayana et al., 2007). Thus, also here only organic materials were found.

The scanning electron microscopy images of *S. nitens* stems, shown in Fig. 2, clearly indicate rather smooth surfaces with a  $\sim 10 \mu\text{m}$  waviness. Within those undulations several smaller grating-like nanostructures are seen. The overall surface smoothness is responsible for the shiny aspect of the stem surface, as it is common for polished materials.

A 3D image of a selected area of  $47 \times 35 \mu\text{m}^2$  of the stem surface is shown in Fig. 3. The waviness and the roughness graphs of a virtual line scan on this 3D image are also shown in Fig. 3. The typical waviness periodicity is of  $10 \pm 1 \mu\text{m}$  and the mean roughness is of  $98 \pm 3 \text{ nm}$ , while the roots mean square (RMS) roughness is of  $128 \pm 3 \text{ nm}$ .

These data are obtained only of one image and therefore are only an indication of the general topography of the stem surface. Nevertheless they are sufficient to rule out visible light interference

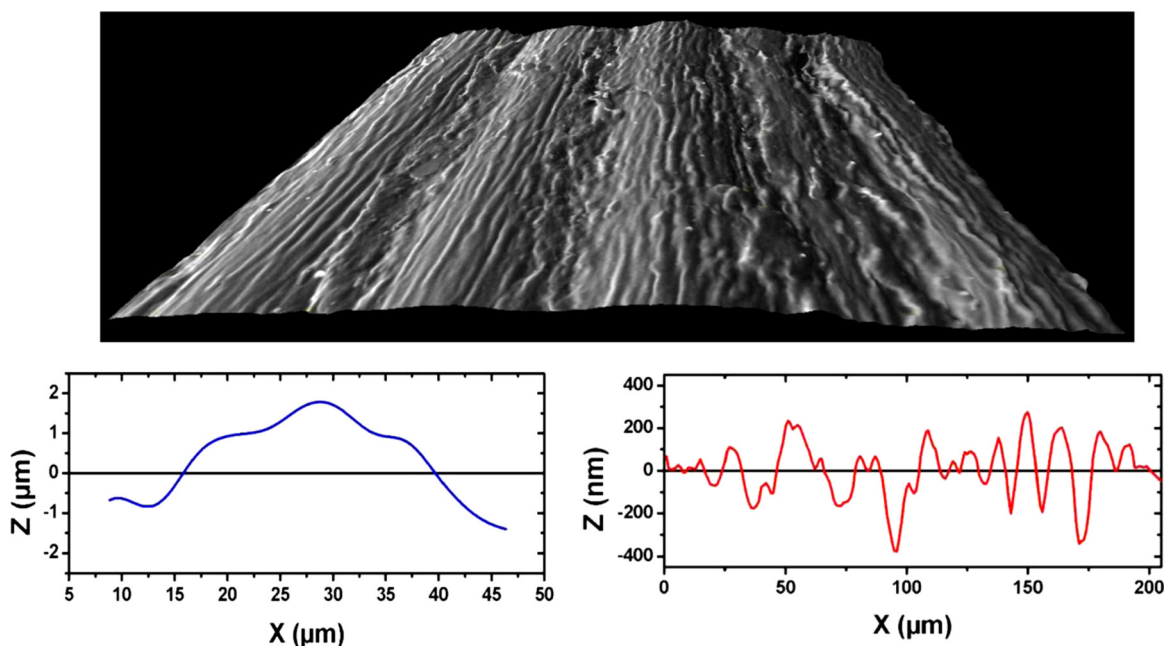


Fig. 3. 3D image and typical waviness (below left) and roughness (below right) of the *S. nitens* surface.

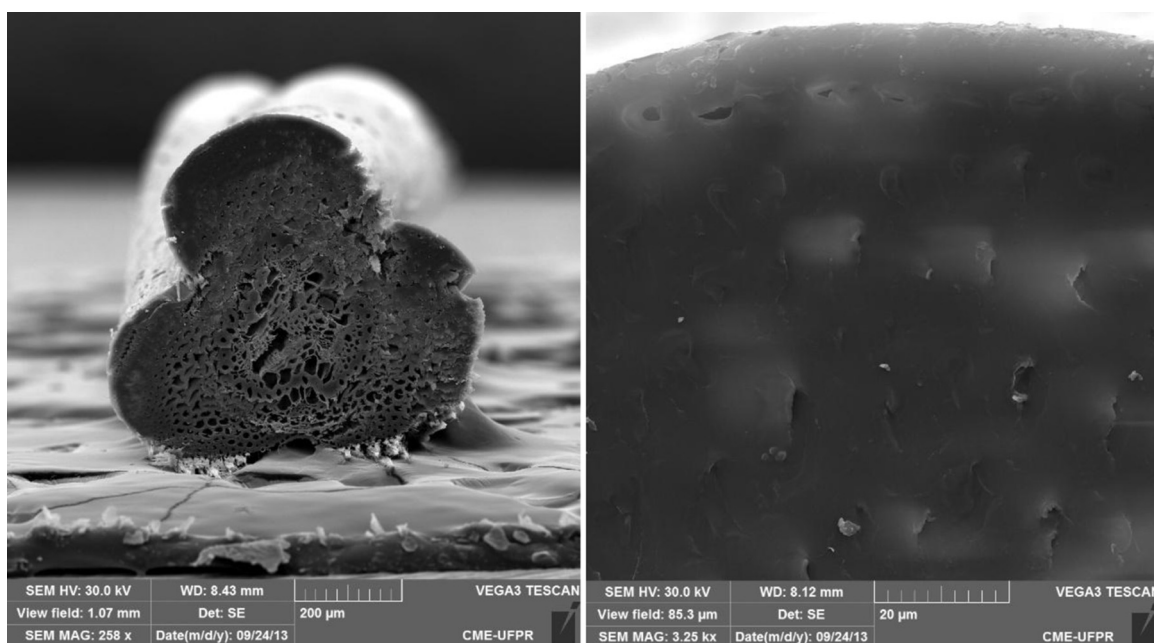


Fig. 4. Cross-sectional SEM images of a *S. nitens* stem. The magnification was, respectively, of 258 X (left) and 3.25 kX (right).

effects, since the features are either far above or far below the visible light wavelength.

The SEM surface characterization per se is not sufficient to rule out an underlying structure. Thus a cross-sectional analysis was mandatory, and the resulting images are shown in Fig. 4.

The dry stems have a peculiar three-lobed arrangement with the xylem and phloem channels far away from the epidermis. The amplified image at the left of Fig. 4 shows a very compact structure starting right below the epidermis. This finding rules out structure related light interference and iridescence.

Additionally, we measured angle resolved light reflection (not shown). The results show that the three RGB wavelengths reflect nearly specularly, while the blue reflectance spectra show clear but weak fluorescence components. No grating interference or

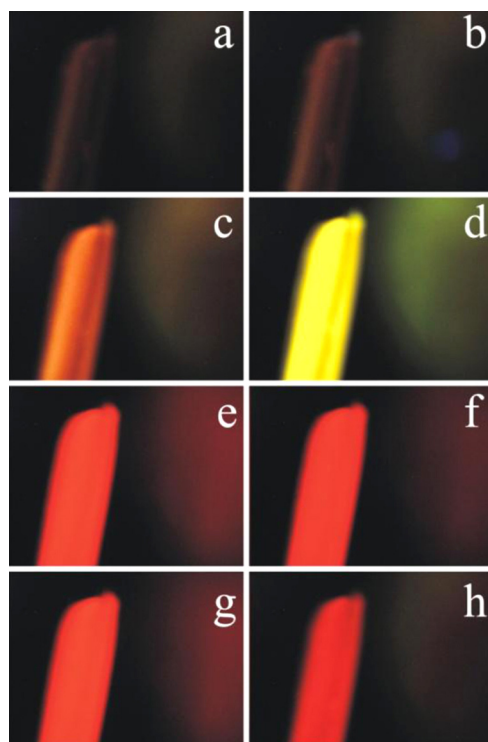
diffraction effects could be detected. This result together with the SEM imaging ruled out surface or near surface structuring as the possible cause of the golden aspect of the scapes.

The stem fluorescence, detected by the reflectance measurements, was further analyzed, by observing the scapes under a fluorescence microscope.

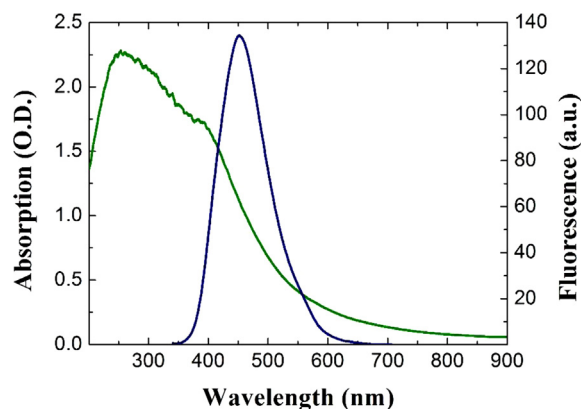
Fig. 5 shows a series of images of the scales illuminated under different wavelengths with several excitation and emission filters. The stems fluorescence is stimulated by a very broad range of wavelengths, starting under ultraviolet excitation up to larger wavelengths.

Having found no surface structure related effects the study concentrated on the organic components besides cellulose and lignin which are present at the stem surface.





**Fig. 5.** Fluorescence images of a *S. nitens* stem obtained with different wavelength excitation illuminations and fluorescence filters. The stem surface fluoresces at all wavelengths, from UV (a) to red (h).



**Fig. 6.** Absorption spectrum of *S. nitens* extracts in water (in green) and fluorescence spectrum (in blue) of the same suspension upon excitation at 325 nm. (For interpretation of the references to color in figure legend, the reader is referred to the web version of the article.)

Fig. 6 shows absorption and fluorescence emission spectra of *S. nitens* extracts in water. The suspension absorbs high frequency light, mainly from the UV to green and fluoresces in the greenish/red range. This broad fluorescence emission, centered at 470 nm, is obtained when the suspension is excited at different wavelengths (between 225 nm and 375 nm). Thus, the extracts are able to absorb short wavelengths and emit at long wavelengths with large Stokes shifts.

Trying to understand these absorption characteristics of the extracts from a theoretical point of view, several molecules found in the *S. nitens* extract, as described in detail by Pacifico et al. (2011), were used. These molecules were identified by those authors as flavonoids. They found 8 molecules, 5 flavones and 3 flavanones. Their numbering and identification are as follows:

- 3',4',5,-tetrahydroxy-6-C-glucopyranosylflavone
- 3',4',5,-trihydroxy-7-methoxy-6-C-glucopyranosylflavone
- 5- 3',4',5,-trihydroxy-7-methoxy-6-C-glucopyranosylflavanone
- 7- 3',4',5,-trihydroxy-7-methoxy-8-C-glucopyranosylflavone
- 8- 4',5,-dihydroxy-3',7-dimethoxy-6-C-glucopyranosylflavone
- 9- 3',4',5,-trihydroxy-7-methoxy-8-C-glucopyranosylflavanone
- 10- 4',5,7-trihydroxy-8-C-glucopyranosylflavanone
- 17- 3',4',5,7-tetrahydroxyflavone

Fig. 7 shows the optimized geometry of 2 representative species of the 8 molecules which were found in the *S. nitens* stems extracts. The figure also shows the calculated ground state HOMO (highest occupied molecular orbital) and the excited LUMO (lowest unoccupied molecular orbital) electron density, respectively at the center and at the right of the figure for the two flavonoids. The other remnant 6 molecules were calculated but are not shown here.

The theoretical absorption spectra of electrons transitioning between ground and excited states obtained from those simulations are shown for all 8 molecules in Fig. 8. Two groups are found. All flavonoids have strong oscillator strengths in the UV region and the flavones 1, 3, 7, 8 and 17 have additionally a significant oscillator strength component toward the blue region of the spectrum. Thus, the flavonoid mixture should absorb light from roughly 200 to 450 nm, according to this theoretical simulation.

Fig. 9 shows a solar spectrum (blue), taken noon 09/14/2012 outside our labs, together with the transmission spectrum of *S. nitens* extractives (black). In green we show the reflectance spectrum of the scapes for sunlight reflected at 45 degrees, obtained at the same date and location. In yellow we show the (blue) solar spectrum multiplied by the (black) absorption spectrum of the extracts. The yellow and green spectra were normalized to the same intensity. The red shift obtained for the resulting yellow spectrum compared to white light is indeed remarkable. Noteworthy is also the superposition of the yellow (calculated) and green (experimental) spectrum.

## 5. Discussion

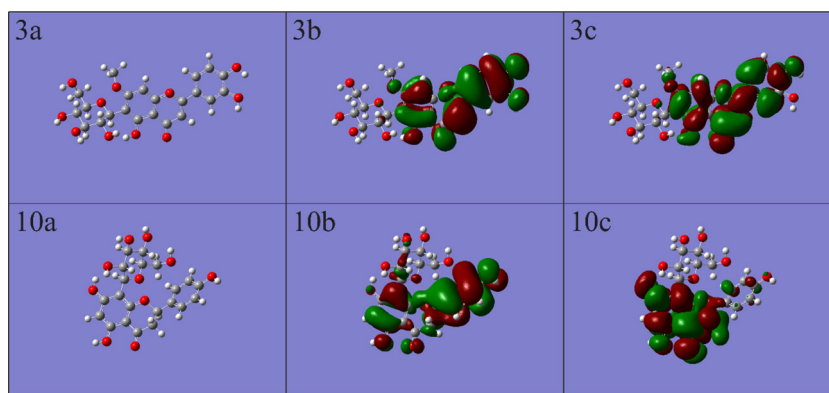
*S. nitens* is native in certain areas of central Brazil and is one of the more than six thousand species of the *Eriocaulaceae* (Schmidt et al., 2007) family.

The typical golden aspect of the dried stems has to originate from the peculiar interaction of white light with the stem surface.

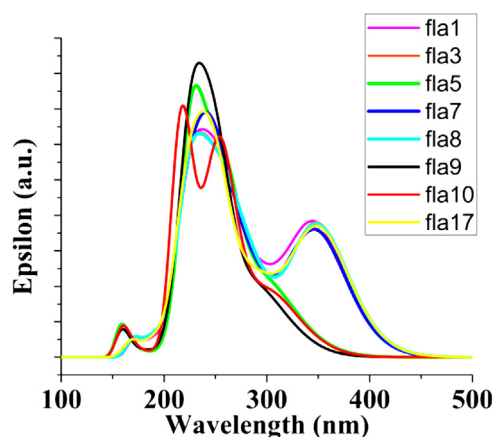
When considering bulk metallic gold, the conduction electrons are essentially free, moving relatively unimpeded through the lattice. Damping effects arise due to collisions of these electrons with lattice imperfections. The reflectivity of metals is caused by the interaction of those free electrons with the incident electromagnetic field. At frequencies corresponding to visible light, the penetration depth is minimal, and light is almost entirely reflected. This gives metals its shiny aspect (Jackson, 1998). In addition, for gold, there occur electron excitations from the 5d band, which is very near to the Fermi edge. These excitations are caused by the absorption of photons in the violet/blue range of the visible spectrum and the reflection of white light shows the typical red coloring of this precious metal (Takata et al., 2004). Our XPS measurements show that no metallic element was found on the golden grass surface.

Several species in fauna, on the other hand, are capable of producing bright golden colors due to surface structures and patterns.

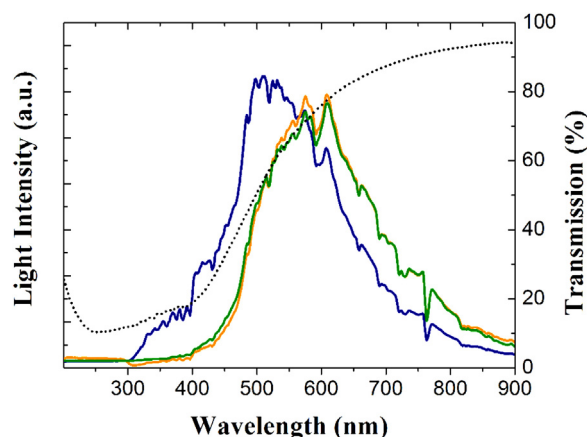
*Coleoptera*, for example, present golden iridescence based on multilayer reflectors on their elytra (Vigneron et al., 2005; Seago et al., 2009). Butterflies display iridescent colors due to cuticles and lamellae held apart by air layers (Vigneron and Simonis, 2012). Jeweled beetles, like the *Chrysina aurigans*, display



**Fig. 7.** Optimized geometry of flavonoids 3 and 10 (left) (see the numbering described in the text) with their respective HOMO (middle) and LUMO (right) molecular orbital electron density.



**Fig. 8.** Theoretically calculated absorption spectra for the 8 flavonoids found and described earlier by Pacifico et al. (2011) (see numbering and identification of the flavonoids in the text).



**Fig. 9.** The four spectra shown are: the solar spectrum on a sunny day in southern Brazil (blue line); the transmission spectrum of *S. nitens* extractives (dotted black line); the experimental reflectance spectrum of *S. nitens* (green line); and the resulting curve (yellow) after multiplication of the solar spectrum by the transmission spectrum.

iridescence through circularly polarized light reflectance from surface structures, similar to cholesteric liquid crystals (Sharma et al., 2009). Iridescence effects in flora are less frequent, but surface photonic structures have been identified in *Leontopodium nivale* subsp. *Alpinum* (Vigneron et al., 2005), in the *Pollia condensata* fruit (Vignolini et al., 2012a) and in the *Ophrys speculum* the mirror orchid flower (Vignolini et al., 2012b). These surface structures were not found for *S. nitens* stems, as clearly shown by our SEM images.

Fortunately, for our purposes, *S. nitens* extracts were analyzed recently in great detail by Pacifico et al. (2011). Their report shows that the extractives (organic molecules which are present in the stems besides cellulose and lignin) are composed mainly by a series of flavonoid derivatives. They extracted 17 different flavonoids of flowers and stems, 6 of them being unambiguously classified as unknown new molecules. The stem extracts could be associated to 8 flavonoids, 6 known and 2 new molecules. They guessed, without the support of further experiments, discussions or data, that those flavonoids could reasonably be considered responsible for the scapes' golden color.

Flavonoids in plants are well described in the literature. They contribute to the color of flowers and are well known to act as UV filters in leaves. Additionally, these molecules have shown antibacterial and antifungal properties, defending plants from diseases. Those peculiar qualities led to research on pharmacological benefits of flavonoids for humans. On another note, flavonoid presence in plants can also deter mammalian herbivores from eating their

leaves. By 1999 more than six thousand flavonoid species were known (Harborne and Williams, 2000).

Our theoretical absorption calculations of these flavonoids (Fig. 8) show that indeed these molecules are capable to absorb UV, violet and blue. The absorption centered at 350 nm extending up to 450 nm is most important, since a significant part of the solar spectrum near the earth's surface is found in this range. This result also explains the UV absorption of flavonoids as described in the literature (Harborne and Williams, 2000). Good agreement of the theoretical calculations with the experimental absorption results of *S. nitens* extracts is also noted.

## 6. Conclusion

We come to conclude that the golden color of dry *S. nitens* stems is caused by the interaction of incident light with the several flavonoids present at the surface epidermis of the dry scapes. Upon reflection at the smooth stem surface, a substantial part, mainly in the high frequency range of the incident light, is absorbed due to the flavonoid presence and not reflected. Therefore, light reflection produces a shift in the solar spectrum peak toward longer wavelengths. In addition, the flavonoids are shown to fluoresce in the longer wavelength range, which also contributes to the red shift.

In this sense, the solar spectrum should be multiplied by the flavonoid's extract transmission curve to yield the resulting reflectance spectrum. The latter is plotted together with the

measured reflectance spectrum in Fig. 9, indicating a very good agreement in support to our hypothesis. These optical properties give *S. nitens* its exquisite reddish golden aspect mimicking spun gold.

Together with conduction electrons (in metals), and interference effects due to surface structures (e.g. some butterflies and beetles), it seems that nature has also found another peculiar way of producing brilliant metallic brightness, based on a quite ingenious combination of surface geometry (smoothness) and light absorption, as we demonstrate here for *S. nitens*, the golden grass.

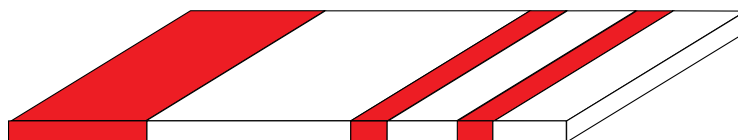
## Acknowledgements

The authors thank CNPq – Conselho de Desenvolvimento Científico e Tecnológico, a Brazilian science fostering agency, for scholarships and financial support

## References

- Frisch, M.J., 2009. Gaussian 09, Revision B.01. Gaussian Inc., Wallingford, CT.
- Harborne, J.B., Williams, C.A., 2000. Advances in flavonoid research since 1992. *Phytochemistry* 55, 481–504.
- Hsu, S.L., Chen, C.M., Wei, K.H.J., 2010. Carbazole-based conjugated polymers incorporating push/pull organic dyes: synthesis, characterization and photovoltaic applications. *Polym. Sci. A: Polym. Chem.* 48, 5126–5134.
- Javelle, M., Vernoud, V., Rogowsky, V.P.M., Ingram, G.C., 2004. Epidermis: the formation and functions of a fundamental plant tissue. *New Phytol.* 189, 17–39.
- Lee, C., Yang, W., Parr, R.G., 1988. Development of the Colle–Salvetti correlation energy formula into a functional of the electron density. *Phys. Rev. B* 37, 785–789.
- Lin, B.C., Cheng, C.P., Lao, Z.P.M., 2003. Reorganization energies in the transport of holes and electrons in organic amines inorganic electroluminescence studied by density functional theory. *J. Phys. Chem. A* 107, 5241–5252.
- Scatena, V.L., Vich, D.V., Parra, L.R., 2004. Anatomia de escapos, folhas e brácteas de *Syngonanthus sect Eulapis* (Bong. ex Koern.) Ruhland (*Eriocaulaceae*). *Acta Bot. Bras.* 18, 825–837.
- Pacifico, M., Napolitano, A., Masullo, M., Hilario, F., Vilegas, W., Piacente, S., dos Santos, L.C., 2011. Metabolite fingerprint of capim dourado (*Syngonanthus nitens*), a basis of Brazilian handicrafts. *Ind. Crops Prod.* 33, 488–496 (2011).
- Jackson, J.D., 1998. *Classical Electrodynamics*, third ed. J. Wiley & Sons, Hoboken, NJ.
- Satyanarayana, K.G., Guimaraes, J.L., Wypych, F., 2007. Studies on lignocellulosic fibers of Brazil. Part I: Source, production, morphology, properties and applications. *Composites A: Appl. Sci. Manufact.* 38, 1694–1709.
- Schmidt, I.B., Figueiredo, I.B., Scariot, A., 2007. Ethnobotany and effects of harvesting on the population ecology of *Syngonanthus nitens* (Bong.) Ruhland (*Eriocaulaceae*), a non-timber forest product from Jalapão region, central Brazil. *Econ. Bot.* 61, 73–85.
- Seago, A.E., Brady, P., Vigneron, J.P., Schultz, T.D., 2009. Gold bugs and beyond: a review of iridescence and structural color mechanisms in beetles (*Coleoptera*). *J. R. Soc. Interface* 6, S165–S184.
- Sharma, V., Crne, M., Park, J.O., Shrinivasarao, M., 2009. Structural origin of circularly polarized iridescence in jeweled beetles. *Science* 325, 449–451.
- Siqueira, G., Abdillahi, H., Bras, J., Dufresne, A., 2010. High reinforcing capability cellulose nanocrystals extracted from *Syngonanthus nitens* (*Capim Dourado*). *Cellulose* 17, 289–298.
- Stephens, P.J., Devlin, F.J., Chabalowski, C.F., Frisch, M.J.J., 1994. Ab initio calculation of vibrational absorption and circular dichroism spectra using density functional force fields. *Phys. Chem.* 98, 11623–11627.
- Takata, Y., Tamasaku, K., Tokushima, T., Miwa, D., Shin, S., Ishikawa, T., 2004. A probe of intrinsic valence band electronic structure: hard X-ray photoemission. *Appl. Phys. Lett.* 84, 4310–4312.
- Vigneron, J.P., Rassart, M., Vértessy, Z., Kertész, K., Sarrazin, M., Biró, L.P., Ertz, D., Lousse, V., 2005. Optical properties and function of the white filamentary hair covering the edelweiss bracts. *Phys. Rev. E* 71, 011906–011908.
- Vigneron, J.P., Simonis, P., 2012. Natural photonic crystals. *Physica B* 407, 4032–4036.
- Vignolini, S., Rudall, P., Rowland, A.V., Reed, A., Moyroud, E., Faden, R.B., Baumberg, J.J., Glover, B.J., Steiner, U., 2012a. Pointillist structural color in Pollia Fruit. *PNAS* 109, 15712–15715.
- Vignolini, S., Davey, M.P., Bateman, R.M., Rudall, P.J., Moyroud, E., Tratt, J., Malmgreen, S., Steiner, U., Glover, B.J., 2012b. The mirror crack'd: both pigment and structure contribute to the glossy blue appearance of the mirror orchid, *Ophrys speculum*. *New Phytol.* 196, 1038–1047.

## BEADS ABOVE THE REST™



### CONTENTS

- I. About the Technology
- II. Reaction Schemes
- III. Materials
  - A. Antibodies
  - B. Membranes
  - C. Microspheres
  - D. Absorbent Pads
  - E. Membrane Backing
  - F. Desiccant
  - G. Plastic Housing
- IV. Costs
- V. Reaction Kinetics
- VI. Calculations
  - A. Membrane Flow Rate
  - B. Membrane Porosity
  - C. Membrane Capacity
- VII. Procedure (Membrane Preparation)
- VIII. Future Trends
- IX. List of Manufacturers/Vendors
- X. References and Patents
- XI. Literature Cited

### I. ABOUT THE TECHNOLOGY

Immunochromatographic assays, also called lateral flow tests or simply strip tests, have been around for some time. They are a logical extension of the technology used in latex agglutination tests, the first of which was developed in 1956 by Singer and Plotz.<sup>1</sup> The benefits of immunochromatographic tests include:

1. User-friendly format.
2. Very short time to get test result.
3. Long-term stability over a wide range of climates.
4. Relatively inexpensive to make.

These features make strip tests ideal for applications, such as home testing, rapid point of care testing, and testing in the field for various environmental and agricultural analytes. In addition, they provide reliable testing that might not otherwise be available to developing countries.

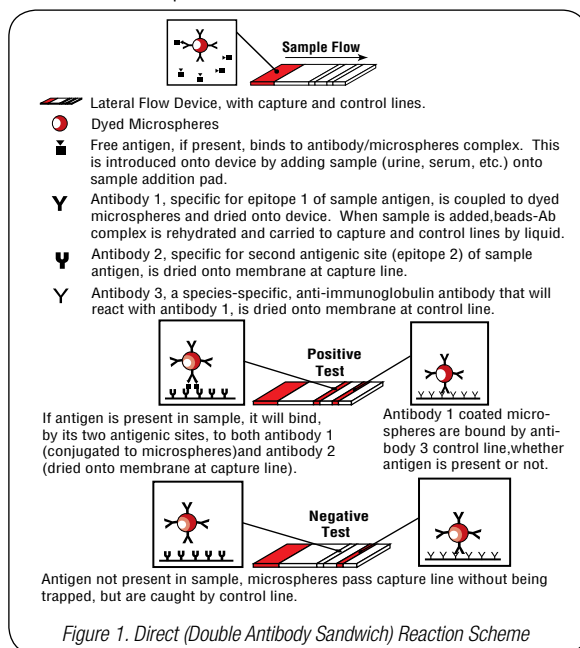
The principle behind the test is straightforward, and will be discussed in

greater depth in a subsequent section. Basically, any ligand that can be bound to a visually detectable solid support, such as dyed microspheres, can be tested for qualitatively, and in many cases, even semi-quantitatively. Some of the more common lateral flow tests currently on the market are tests for pregnancy, Strep throat, and Chlamydia. These are examples of conditions for which a quantitative assay is not necessary.

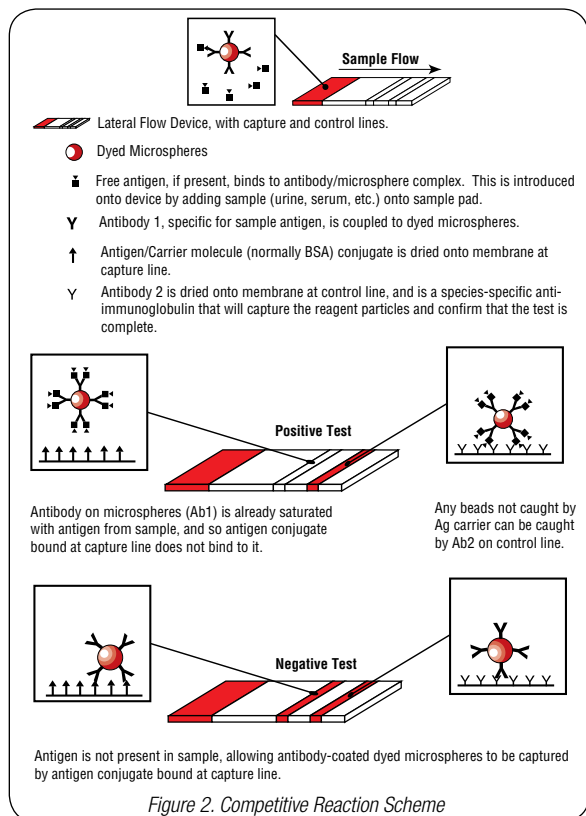
### II. REACTION SCHEMES

The two predominant approaches to the tests are the Non-Competitive (or direct) and Competitive (or competitive inhibition) reaction schemes. These can best be explained graphically, as shown in Figures 1 and 2.

The double antibody sandwich format is used when testing for larger analytes with multiple antigenic sites, such as LH, hCG, and HIV. In this case, less than an excess of sample analyte is desired so that some of the microspheres will not be captured at the capture line, and will continue to flow toward the second line of immobilized antibodies, the control line. This control line uses species-specific anti-immunoglobulin antibodies, specific for the conjugate antibodies on the microspheres.



The competitive reaction scheme is used most often when testing for small molecules with single antigenic determinants, which cannot bind to two antibodies simultaneously. If this format is chosen, it is important to pay close attention to the amount of antibody bound to the microspheres, in relation to the amount of free antigen in the sample. If the sample does not contain an excess of free antigen, some of the microspheres will bind at the capture line, giving a weak signal and making the test result ambiguous.

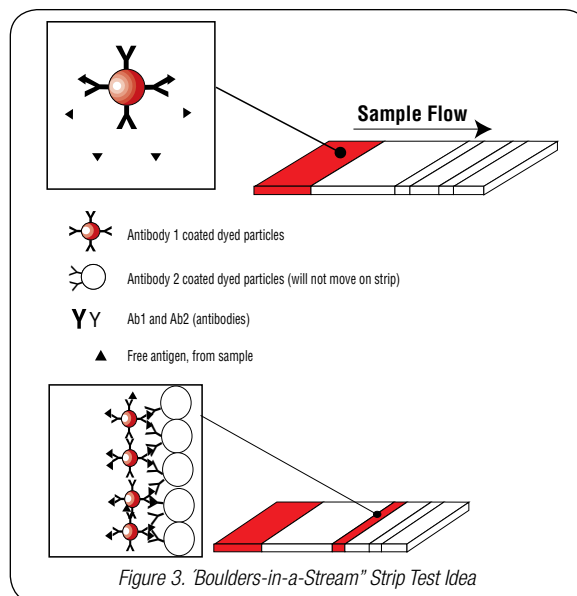


Normally, the membranes used to hold the antibodies in place are made up of primarily hydrophobic materials, such as nitrocellulose. Both the microspheres used as the solid phase supports and the conjugate antibodies are hydrophobic, and their interaction with the membrane allows them to be effectively dried onto the membrane. These hydrophobic interactions are very reliable, so much so, that getting the hydrophobically bound antibody/microsphere complexes to enter into the mobile phase upon sample introduction can be difficult. One variation to the above reaction schemes which has been proposed is the “Boulders in a Stream” approach.<sup>2</sup> This gets around the problem of protein-coated microspheres sticking to the membrane nonspecifically by using a membrane that is inert, and does not bind antibodies. This makes migration of the mobile phase antibodies very efficient and reliable. The capture antibodies, rather than being physically bound by the membrane, are attached to large microspheres, which will be held in place physically, rather than chemically, while the sample passes by, much like boulders in a stream. This can be used for both of the above-mentioned reaction schemes, and is diagrammed in Figure 3.

Some considerations involved in this format are:

1. Choose a hydrophilic strip where Abs will NOT stick, with porosity so microspheres can move and boulders cannot.

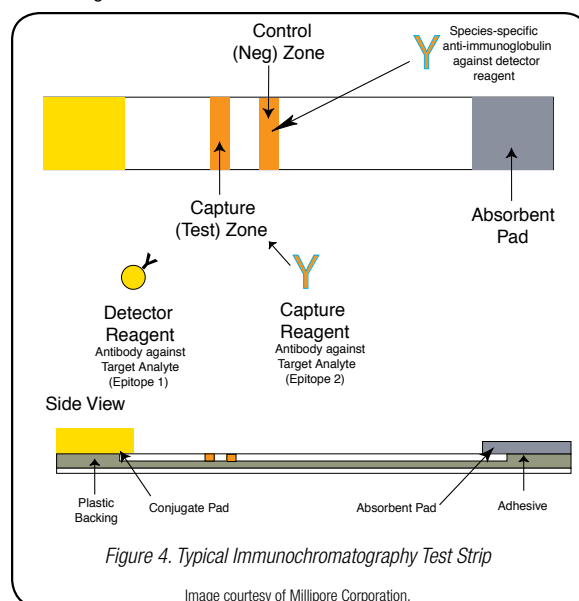
2. Add sample (with antigen). Sample flow moves dyed microspheres down membrane.
3. Capture antibodies at test line held in place by attachment to undyed microspheres, which are too large to migrate on the membrane.



These principles are well-documented in the literature, and appear very straightforward. However, in order to maximize efficiency and minimize development and production costs, there are some guidelines which, if followed, could possibly reduce some of the hurdles normally associated with the development of a new technology.

### III. MATERIALS

A good place to start is to examine the raw materials that will deliver the highest quality at the lowest cost. The constituents of a lateral flow test can be shown in Figure 4.



Specifically, the constituents are as follows:



## A. Antibodies

There are three types of antibodies.

1. Stationary Phase
  - a. Capture Line Antibodies
  - b. Control Line Antibodies
2. Mobile Phase
  - a. Conjugate Antibodies (Antibodies on dyed microspheres, to which the sample analyte will bind initially). *Note:* If you are testing for small molecules using the competitive binding format, you will also need purified antigen, or an antigen / carrier molecule (BSA) conjugate, for attachment to test lines.)

## B. Membranes

The membrane chosen is dependent upon the approach that you choose, as previously mentioned. Some options for this include:

1. Nitrocellulose (High Protein Binding)
2. Cellulose Acetate (Low Protein Binding)
3. Glass Fiber Membranes (Non-Protein Binding)

Membrane manufacturers generally offer a wide variety of material types and pore sizes, so it is a good idea to investigate several options before deciding which specifications most closely match your test objectives.

## C. Microspheres

There are several sizes and polymers to choose from. Conjugate antibody or antigen is attached, and microspheres migrate down the membrane upon introduction of your sample. Some hints to choosing an appropriate particle follow.

1. Optimal flow rate is achieved by choosing microspheres 1/10 the pore size of the membrane through which they will migrate, or smaller.
2. Optimal colors for visualization in various types of samples:
  - a. Whole blood: Black or dark blue
  - b. Serum: Bright red or bright blue
  - c. Urine: Green, blue, red or black
  - d. Saliva: Any dark color
  - e. Cerebral spinal fluid: Any dark color
3. To minimize hindered flow caused by the inherent hydrophobic interactions between membrane and particle (in the case of a hydrophobic membrane), pretreatment of the membrane with a substance that will maintain a small distance between the microspheres and the membrane, yet which can be easily rehydrated, is often helpful (Figure 5). Examples of substances commonly used are sucrose, various water soluble inert polymers, and surfactants. The idea is to choose a substance that is stable in dry form, yet dissolves easily upon rewetting to allow the antibody bound microspheres to flow easily through the membrane upon addition of the sample. (A sample procedure for doing this is included later in this text).

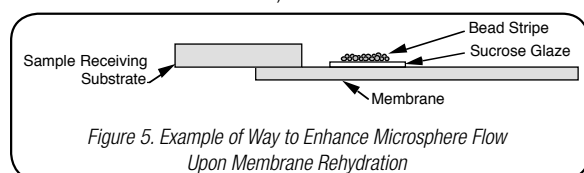


Figure 5. Example of Way to Enhance Microsphere Flow Upon Membrane Rehydration

In addition to treating the membranes, the microspheres themselves can also be pre-treated with surfactants, synthetic or protein-based blockers. If

done correctly, this can also help to reduce the problem of reagent mobility upon sample introduction. Much work has been done in developing optimum mixtures of these various polymers, detergents, and blockers. A list of suppliers of these materials and information on their use is listed at the end of this TechNote.

## D. Conjugate Pads

These are the parts of the lateral flow device to which the sample is added. Ideally, this is a pad made of a material that can absorb a large amount of sample, and will then release this sample into the membrane at a steady, controlled rate. A good source of information regarding these is Whatman, whose contact information is included in this TechNote.

## E. Membrane Backing

This is added to give strength to the membrane, which is often very fragile. The membrane can be attached by adhesives or by a process called direct casting. This is advantageous, as it eliminates the possibility of adhesives interfering with the test, so when ordering the membranes, it is important to specify which type is preferred.

## F. Desiccant

Desiccant can be added into the pouch separately or incorporated into the absorbent pad. It is used to keep ingredients dry during storage before use.

## G. Plastic Housing

This is the case for the test, and the foil pouch in which the final product is presented. A good source of information regarding the various possibilities for each of these is Bio•Dot.

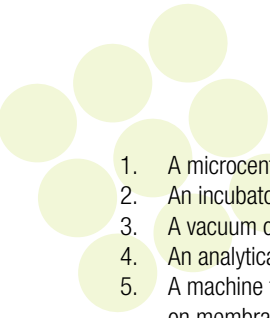
A look at the number of materials that are needed for these tests might be somewhat intimidating. However, the costs of mass producing these is surprisingly low.

## IV. COSTS

|                       |                  |
|-----------------------|------------------|
| Test Line Antibodies: | \$0.01 per test  |
| Membranes:            | \$0.02 per test  |
| Control Antibodies:   | \$0.01 per test  |
| Absorbent Pad:        | \$0.001 per test |
| Conjugate Antibodies: | \$0.02 per test  |
| Sample Pad:           | \$0.002 per test |
| Latex Microspheres:   | \$0.01 per test  |
| Membrane Backing:     | \$0.01 per test  |
| Desiccant:            | \$0.02 per test  |
| Pouch:                | \$0.08 per test  |
| Plastic Housing:      | \$0.20 per test  |

Labor is generally estimated at approximately twice the raw material cost, bringing the total cost for materials and assembly to approximately \$0.38 per test. Some of the above-mentioned items are available in a range of prices, and in each case, the total is based on the high estimate. This does not take into consideration research costs, but considering that much of the information needed to develop these tests is readily available, there is really no need to allow cost to be a hindrance to a good strip test development idea.

The second consideration, of course, is the capital equipment needed to make these tests, which is relatively modest compared to other immunodiagnostic technologies. What is initially needed, and is often already found in most laboratories, is:

- 
1. A microcentrifuge capable of at least 15,000 rpm
  2. An incubator
  3. A vacuum oven
  4. An analytical balance
  5. A machine for spraying or printing antibodies/antigens on membranes

When in the research stage, it can be beneficial to try the process on some borrowed assembly equipment before investing in this for scaling up to manufacturing lots.

## V. REACTION KINETICS

Now that we have looked at the principles behind these tests and some specifics regarding their manufacture, let's consider some of the factors involved in choosing the appropriate raw materials.

Test developers are often concerned with reaction kinetics. A faster test will not only be more attractive commercially, but often will be more accurate. On the other hand, the test must proceed slowly enough that antibody / antigen reactions are able to occur. Some principles that govern the kinetics of immunochromatographic assays follow:

1. The reaction rate decreases with the square of the increase in flow rate.
2. Assay time decreases with increasing flow rate.
3. Sensitivity decreases with the square of the increase in flow rate.
4. Reagent usage increases with increasing flow rate.
5. Background (streaking on the membrane prior to the capture antibody line) decreases with increasing flow rate.
6. Flow rate decreases as distance from the origin increases.
7. The amount of protein bound decreases (for nitrocellulose membranes) as the pore size increases.

Therefore, while increased flow rate is generally desirable, and it is known that one of the major influences affecting this is the relationship between the microsphere and membrane pore size, there is a point of diminishing returns in trying to increase this variable. The above principles should be closely examined and weighed against each other in the research phase before deciding on the exact parameters for the final product.

## VI. CALCULATIONS

Some of the variables to take into consideration when setting up a lateral flow test include:

### A. Flow Rate of Membrane

This is determined empirically, and will vary according to the viscosity of the sample used. Data for the flow rates of specific membranes with specific sample types are supplied by the manufacturer.

### B. Membrane Porosity

This describes the fraction of the membrane that is air (e.g., a membrane with a porosity of 0.7 is 70% air), and will have an impact on the flow rate of the membrane.

### C. Membrane Capacity

By definition, this is the volume of sample that can pass through a given membrane per unit time, and is determined as a factor of the length (L), width

(W), thickness (T), and porosity (P) of the membrane:

$$L \times W \times T \times P = \text{Membrane Capacity}$$

A second important calculation is the determination of the amount of antibody that can be bound per unit area of membrane (pertaining to the capture and control lines). This calculation involves the following variables.

Dimensions of representative capture antibody line:  $0.1 \text{ cm} \times 0.8 \text{ cm} = 0.08 \text{ cm}^2$ . Binding capacity of membrane used for capture antibody (obtained from the membrane manufacturer). In this example, we will use  $50 \mu\text{g}/\text{cm}^2$  - a low end estimate for nitrocellulose membranes. Therefore, the binding capacity of the membrane for the capture antibodies is simply a factor of these variables:

$$0.08 \text{ cm}^2/\text{line} \times 50 \mu\text{g}/\text{cm}^2 = 4.0 \mu\text{g}/\text{line}$$

This is a theoretical example, but from past experience we have learned that in practice, a tenth of this is normally sufficient. Therefore, as with all theoretical calculations, they can provide a baseline which is optimized for the specific conditions and reagents involved in each particular test.

There are other calculations involved in setting up this type of test, some of which are not within the scope of this text. However, the suppliers of the various raw materials are normally good sources for this information, and are generally happy to help ease the development process. For example, some important considerations involving the microspheres are the best type of binding (covalent attachment or simple adsorption), as well as the proportion of antibody to microspheres for best sensitivity in the final product.

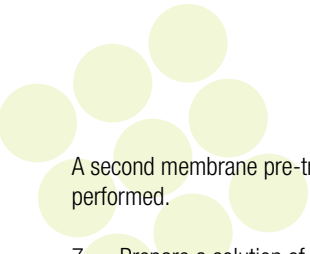
Useful information regarding this can be found in our TechNote 204, *Adsorption to Microspheres*, and TechNote 205, *Covalent Coupling*, both of which can be downloaded from our website. Another good source for further information is our list of related references, which is supplied at the end of this TechNote.

## VII. PROCEDURE (MEMBRANE PREPARATION)

The following is a procedure that has been used successfully in the past. This is specific for an hCG test in urine, using a nitrocellulose membrane, but can be easily modified to accommodate a wide range of analytes and test formats.

### Preparation of Reagent Strip

1. A rectangular sheet of 3-10  $\mu\text{m}$  pore size nitrocellulose membrane is cut with dimensions of 15cm x 8cm (representative dimensions for this type of test).
2. A reaction zone can be formed by applying a line of capture antibody (in this case anti- $\beta$  hCG) across the long dimension of the strip, approximately 3cm from the top (arbitrary) of the strip.
3. The width of this antibody stripe should be approximately 2mm, and this can be controlled by using an airbrush or microprocessor controlled microsyringe.
4. Dry for 1 hour at room temperature.
5. Soak membrane with an aqueous solution of inert compound or polymer of your choice to block excess binding sites on the membrane (in this example, polyvinyl alcohol, 1% w/v in 20 mM Tris buffer, pH 7.4) for 30 minutes at room temperature.
6. Rinse membranes in distilled water, and dry for 30 minutes at 30°C.



A second membrane pre-treatment, allowing for better flow, can now be performed.

7. Prepare a solution of 30% sucrose in distilled water, and apply this to the membrane where the conjugate reagent is to be located (normally 1cm from the bottom, with a width of 3-5mm).
8. Bake membrane for 1 hour at 40°C.
9. Apply antibody-coated microspheres to membrane over sucrose glaze, keeping dimensions consistent with sucrose glaze.
10. Place bottom of membrane (approximately 0.5cm below reaction zone) between absorbent pads, saturate these with Synthetic Urine (containing purified antigen), and observe flow characteristics and color formation at capture zone.

Modifications can then be made as necessary to optimize the reaction kinetics discussed previously.

## VIII. FUTURE TRENDS

The technology involved in these lateral flow tests is exciting in and of itself, in that it provides an accurate, easy-to-use, rapid diagnostic tool. Currently, the principles governing this test are being extended to allow for some exciting new possibilities for future tests. Some development possibilities that are currently being evaluated follow.

1. By using the same format for lateral flow tests and dyeing the solid support with a fluorescent dye, the possibility exists to create a truly quantitative test. If the spectral properties of the dyed microspheres to which the antibodies are conjugated are known, the amount of antibody bound at the capture line can be precisely quantified using a fluorometer. The benefits to this would include all of those lateral flow tests that currently exist. In addition, the tests could, theoretically, become truly quantitative assays.
2. By placing multiple lines of capture antibodies on the membrane, each for a different analyte, one can develop a single test for more than one analyte. An obvious application for this would be to create a drugs-of-abuse test panel. Biosite's Triage® is based on this format.<sup>3</sup> Diagnostically, this principle could be used for panels for which multiple analytes can be tested, such as immune diseases, allergies, or even Multiple Chemical Sensitivity Disorder. Also, as the technology involved in preparing these tests continues to develop, it should be possible to combine both of these ideas (1. and 2.) to make a low-cost, rapid quantitative diagnostic assay for multiple analytes.
3. Another exciting application of this technology is in the environmental field. This format presents an opportunity to develop a rapid, reliable test that can be performed in the field for anything from water pollution to plant disease. Because these diagnostic tests must often be performed in harsh environments, the lateral flow format is ideal. With proper preparation and foil pouching, no refrigeration or special handling is required.
4. As knowledge in the field of molecular genetics continues to expand rapidly, the interest in using a simple format for detecting various genetic markers, and DNA- or RNA-related infectious disease pathogens will increase. The guiding principle behind this type of test, the ability to bind a ligand from solution to a solid support, can be performed on genetic material as well as proteins, making the application of this technology in this field almost limitless.
5. One development alternative that seems to have good potential for strip tests involves Printed Liquid Circuit Technology, which by definition is

a porous media element in which fluid flow is controlled by impervious barriers made using a printing process. This utilizes fluid flow in a set pattern that is analogous to simple electronic circuits, and offers the capability of threshold (qualitative), semi-quantitative, and true quantitative assays. Potential improvements include automatic reagent addition, lower costs, smaller sample size, and automatic sample metering. The intricacies of this technology are beyond the scope of this text, but companies currently working with printed liquid circuits are listed among the Manufacturers/Vendors at the end of this TechNote.

6. An idea, that we think can be advantageous in terms of reduced development time, would be to use protein-coated microspheres, such as our ProActive® Streptavidin-coated microspheres. By biotinylating the desired conjugate antibodies and taking advantage of the strong affinity that biotin has for streptavidin, the antibodies are easily attached to the microspheres. Alternatively, protein A-coated microspheres will bind many IgG's at the Fc region, allowing for optimized, directed antibody attachment. In this way, a series of tests could be developed rather quickly, using the same solid support, membrane, housing, etc. The only variable would be the conjugate and capture line antibodies used for each test. Additional information regarding these microspheres can be found in our TechNote 101, *ProActive® Protein-Coated Microspheres*.

## IX. LIST OF MANUFACTURERS / VENDORS

*Note:* This list of vendors is intended to help you find the appropriate reagents and procedures for developing your tests and does not constitute a product endorsement on our part. This list is not all-encompassing and we encourage you to explore several reagent vendors before committing your time and resources.

### Membranes:

- |   |   |
|---|---|
| <ul style="list-style-type: none"> <li>• Bio•Dot<br/>11781 Sky Park Circle<br/>Irvine, CA 92614<br/>Tel: 949-440-3685<br/>Fax: 949-440-3694</li> </ul>                                      | <ul style="list-style-type: none"> <li>• Millipore<br/>290 Concord Road<br/>Billerica, MA 01821<br/>Tel: 800-645-5476<br/>Fax: 800-645-5439</li> </ul>            |
| <ul style="list-style-type: none"> <li>• Micron Separations, Inc.<br/>135 Flanders Road<br/>Westborough, MA 01581<br/>Tel: 800-444-8212<br/>Fax: 508-366-5840</li> </ul>                    | <ul style="list-style-type: none"> <li>• Pall Biosciences<br/>2200 Northern Blvd.<br/>East Hills, NY 11548<br/>Tel: 800-645-6532<br/>Fax: 516-484-5228</li> </ul> |
| <ul style="list-style-type: none"> <li>• Whatman, Schleicher, &amp; Schuell<br/>200 Park Avenue, Suite 210<br/>Florham Park, NJ 07932<br/>Tel: 800-WHATMAN<br/>Fax: 973-245-8301</li> </ul> |   |

### Antibodies:

- |  |   |
|--|---|
| <ul style="list-style-type: none"> <li>• Dako Corporation<br/>6392 Via Real<br/>Carpinteria, CA 93013<br/>Tel: 805-566-6655<br/>Fax: 805-566-6688</li> </ul> | <ul style="list-style-type: none"> <li>• Sigma-Aldrich Chemical Co.<br/>P.O. Box 14508<br/>St. Louis, MO 63178<br/>Tel: 800-325-3010<br/>Fax: 800-240-4668</li> </ul> |
|--|---|



- Janssen Biochimica  
Turnhoutseweg 30  
Beerse B-2340 Belgium  
Tel: 014 60 21 11  
Fax: 014 60 28 41

- Jackson ImmunoResearch Laboratories, Inc.  
872 West Baltimore Pike  
West Grove, PA  
Tel: 800-367-5296  
Fax: 610-869-0171

There are many other good antibody sources. A reference is Linscott's Directory.

- Linscott's Directory  
6 Grove Street  
Mill Valley, CA  
Tel: 415-389-9674  
Fax: 415-389-6025

#### Hardware (Assembly, Finishing Equipment):

- Bio•Dot  
11781 Sky Park Circle  
Irvine, CA 92614  
Tel: 949-440-3685  
Fax: 949-440-3694
- Kinematic Automation, Inc  
P.O. Box 69  
Twain Harte, CA 95383  
Tel: 209-532-3200  
Fax: 209-532-0248

#### Polymers/Blockers to Enhance Membrane Flow:

- Pragmatics, Inc.  
29477 County Road 16W  
Elkhart, IN 46516  
Tel: 800-213-1293  
Fax: 219-262-3911
- RDI Div. of Fitzgerald Ind.  
34 Junction Square Drive  
Concord, MA 01742  
Tel: 978-371-6446  
Fax: 973-371-2266  
email: antibodies@fitzgerald-fii.com

#### Printed Liquid Circuit Information Resources

- British Technology Group  
101 Newington Causeway  
London SE1 6BU  
Tel: 0171 403 6666  
Fax: 0171 403 7586  
Contact: Dr. Ed Footitt
- Bio•Dot  
11781 Sky Park Circle  
Irvine, CA 92614  
Tel: 949-440-3685  
Fax: 949-440-3694

## X. REFERENCES AND PATENTS

1. **Tsuda, S., et al.** 1992. *Plant Disease*, 76: 466-469.
2. **Claussen, C.A.** 1994. *NASA Tech Briefs*, 23a.
3. **Brown, W.E.I, S.E Safford, J.M. Clemens.** November 1992. Solid-phase analytical device and method for using same. U.S. Patent: 5,160,701.
4. **Cole, F.X., P.C. MacDonnell, N.J. Ciccia.** August 1992. Porous strip from assay device method. U.S. Patent: 5,141,850.
5. **Fan, E., et al.** August 1991. Immunochromatographic assay and method of using same. International Patent: WO 91/12336.
6. **Fitzpatrick, J., R. Lenda.** September 1995. Method and device for detecting the presence of analyte in a sample. U.S. Patent: 5,451,504.
7. **Imrich, M.R., J.K. Zeis, S.P. Miller, A.D. Pronovost.** May 1995. Lateral flow medical diagnostic assay device. U.S. Patent: 5,415,994.
8. **Kang, J., B. Youn, Y.H. Oh.** September 1996. Immunoassay devices and materials. U.S. Patent: 5,559,041.
9. **Koike, T.** August 1991. Immunochromatographic assay method. European Patent: EP 0 505 636
10. **May, K., M.E. Prior, I. Richards.** November 1988. Immunoassays and devices therefore. International Patent: WO 88/08534.
11. **Rosenstein, R.W.** July 1988. Solid phase assay. European Patent: EP 0 284 232.
12. **Sommer, R.G.** October 1996. Quantitative detection of analytes on immunochromatographic strips. U.S. Patent: 5,569,608.
13. **Allen, et al.** November 1998. Electronic assay device and method. U.S. Patent: 5,837,546.

## XI. LITERATURE CITED

1. **Singer, J.M, C.M. Plotz.** 1956. The Latex Fixation Test: Application to the serologic diagnosis of rheumatoid arthritis. *Am J Med*, 21: 888.
2. **Bangs, L.B.** 1997. Immunological applications of microspheres. The Latex Course.
3. **Bio•Site Company.** 11030 Roselle Street, San Diego, CA 92121.
4. **Jones, K.D.** 1999. Troubleshooting protein binding in nitrocellulose membranes. Part I: Principles, Part II: Common problems. *IVD Technology*, 5: 2-3, 32-41, 26-35.

JD - 8/98

Copyright 1999, Bangs Laboratories, Inc.  
All Rights Reserved